

Université de Montréal

RÉGULATION DE LA CYCLO-OXYGÉNASE-2 DANS LES
KÉRATINOCYTES CANINS NORMAUX ET NÉOPLASIQUES

Par
Nadia Pronovost

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade Maître ès sciences (M.Sc)
en sciences vétérinaires
option pathologie

Août, 2003

©Nadia Pronovost, 2003



SF
607
U54
2003
v.020

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

RÉGULATION DE LA CYCLO-OXYGÉNASE-2 DANS LES
KÉRATINOCYTES CANINS NORMAUX ET NÉOPLASIQUES

Présenté par :

Nadia Pronovost

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre Hélie
Président-rapporteur

Dre Monique Doré
Directrice de recherche

Dr Jean Sirois
Codirecteur de recherche

Dre Manon Paradis
Membre du jury

Mémoire accepté le :

Résumé

Le carcinome spinocellulaire est l'un des cancers les plus communs chez le chien. Pourtant, il existe relativement peu d'information au sujet des mécanismes moléculaires impliqués dans son développement. Des études récentes indiquent que la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) est impliquée dans la carcinogénèse de divers types de cancer. Nous avons récemment rapporté que la COX-2 est fortement exprimée dans les kératinocytes des carcinomes spinocellulaires canins, alors que la peau normale du chien n'exprime pas la COX-2. L'objectif de ce projet était de caractériser la régulation de la COX-2 dans les kératinocytes canins en utilisant un modèle *in vitro*. Des lignées cellulaires dérivées de kératinocytes canins normaux (CK) et néoplasiques (SCC) ont été mises en culture en absence ou présence d'agonistes, et des immunobuvardages, de l'immunocytochimie, des analyses radioimmunologiques et une mesure de la prolifération cellulaire ont été employés pour étudier la régulation de la COX-2 et ses effets. Les résultats ont démontré que les kératinocytes cancéreux ont une expression basale de COX-2 plus élevée que les kératinocytes normaux et que l'expression de la COX-2 dans les deux lignées cellulaires diminue en fonction du temps en l'absence de sérum. Dans les deux lignées cellulaires, la stimulation avec du phorbol 12-myristate 13-acetate, de l'interféron- γ canin ou du tumor necrosis factor- α induit une augmentation de la COX-2, cette induction étant plus forte dans les kératinocytes cancéreux que dans ceux normaux. La mesure de PGE₂ (un des prostanoïdes les plus communs possédant des activités biologiques importantes) a indiqué que les kératinocytes cancéreux produisent davantage de PGE₂ que les kératinocytes normaux, avec ou sans stimulation. De plus, la production de PGE₂ par les kératinocytes normaux et cancéreux a pu être inhibée par un inhibiteur spécifique de la COX-2, le NS-398. Ces résultats indiquent que les kératinocytes néoplasiques canins expriment plus de COX-2 que les kératinocytes normaux, suggérant que la

COX-2 pourrait être impliquée dans le développement des carcinomes spinocellulaires chez le chien.

Mots clés : Cyclo-oxygénase-2, prostaglandine G/H synthétase-2, prostaglandines, carcinome spinocellulaire, kératinocytes, chiens.

Abstract

Squamous cell carcinoma is one of the most common cancers in dogs, yet relatively little is known about the molecular events involved in its development. Rapidly mounting evidence implicates cyclo-oxygenase-2 (COX-2) in the oncogenesis of various types of cancer. We have previously reported that COX-2 is strongly expressed by keratinocytes in canine squamous cell carcinomas while normal canine skin does not express COX-2. The objective of this study was to characterize the regulation of COX-2 in canine keratinocytes using an *in vitro* model. Cell lines derived from normal (CK) and neoplastic canine keratinocytes (SCC) were cultured in the absence or presence of agonists, and immunoblots, immunocytochemistry, radioimmunoassays and a cell proliferation assay were used to study COX-2 regulation and effects. Results showed that SCC had a higher baseline expression of COX-2 protein than CK, and that COX-2 expression in both cell lines decreased in a time-dependent manner with serum starvation. In both cell lines, stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate, canine interferon- γ or tumor necrosis factor- α induced a time-dependent increase in COX-2 protein, with COX-2 induction being stronger in SCC than in CK. Measurement of PGE₂ (one of the most common prostanoid with potent biological activities) revealed that SCC produce more PGE₂ than CK, under both baseline and stimulated conditions. Additionally, PGE₂ synthesis of both CK and SCC could be inhibited in a concentration-dependent manner by the specific COX-2 inhibitor NS-398. These results indicate that canine neoplastic keratinocytes express more COX-2 than normal keratinocytes, suggesting that COX-2 could be involved in skin carcinogenesis in dogs.

Keys words : Cyclo-oxygenase-2, prostaglandin G/H synthase-2, prostaglandins, squamous cell carcinoma, keratinocytes, dogs.

Table des matières

	Page
Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
Recension de la littérature.....	3
1. Le carcinome spinocellulaire (CSC).....	3
1.1 Les kératoses actiniques.....	3
1.2 L'épidémiologie et la pathogénie du CSC chez l'humain.....	3
1.3 L'épidémiologie et la pathogénie du CSC chez le chien.....	4
2. La cyclo-oxygénase (COX).....	6
2.1 La cascade de l'acide arachidonique.....	6
2.2 Les isoformes de la COX.....	8
2.2.1 La COX-1.....	8
2.2.2 La COX-2.....	9
2.2.3 La COX-3.....	11

2.3 Les agents régulateurs de la COX-2	11
3. Les prostaglandines et le cancer	13
3.1 Les prostaglandines et la croissance tumorale.....	14
3.2 Les prostaglandines et l'apoptose	16
3.3 Les prostaglandines et la réponse immunitaire	17
4. Les médicaments anti-inflammatoires	19
4.1 Les inhibiteurs non-sélectifs de la COX-2.....	19
4.2 Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2.....	21
5. Évidences du rôle de la COX-2 dans le cancer	24
5.1 Expression de la COX-2 dans les CSC <i>in vivo</i> spontanés.....	25
5.2 Expression de la COX-2 dans les CSC <i>in vivo</i> expérimentaux.....	26
5.3 Régulation de la COX-2 dans les kératinocytes <i>in vitro</i>	28
Objectifs	31
Article : Expression and regulation of cyclo-oxygenase-2 in normal and neoplastic canine keratinocytes	32
Discussion.....	67
Conclusion	72
Bibliographie	73

Liste des tableaux

Page

Recension de la littérature

Tableau I. Sommaire des propriétés de la COX-1 et la COX-2 10

Liste des figures

Page

Recension de la littérature

Figure 1. Cascade de l'acide arachidonique.	7
Figure 2. Médicaments agissant sur la COX-1 et la COX-2	20
Figure 3. Sélectivité à la COX-2 de certains médicaments anti-inflammatoires	23

Article

Figure 1. Effect of serum deprivation on COX-2 protein and PGE ₂ synthesis in normal and neoplastic canine keratinocytes	53
Figure 2. Immunocytochemical detection of COX-2 in normal and neoplastic canine keratinocytes.....	55
Figure 3. Time-dependent induction of COX-2 protein and PGE ₂ synthesis by PMA in normal and neoplastic canine keratinocytes.	57
Figure 4. Time-dependent induction of COX-2 protein and PGE ₂ synthesis by rcaINF- γ in normal and neoplastic canine keratinocytes.....	59
Figure 5. Time-dependent induction of COX-2 protein and PGE ₂ synthesis by TNF- α in normal and neoplastic canine keratinocytes.....	61
Figure 6. Effect of COX inhibition on PGE ₂ synthesis by canine normal and neoplastic keratinocytes.	63
Figure 7. Effect of COX inhibition on cell proliferation of normal and neoplastic canine keratinocytes.....	65

Liste des sigles et abréviations

AA :	acide arachidonique
ADN :	acide désoxyribonucléique
AINS :	anti-inflammatoire non-stéroïdien
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
C/EBP :	CCAAT/enhancer-binding protein
CK :	kératinocyte canin
COX :	cyclo-oxygénase
CRE :	élément de réponse de l'AMPc
CSC :	carcinome spinocellulaire
EGF :	epidermal growth factor
EGFR:	epidermal growth factor receptor
EP1:	récepteur prostaglandine E-1
EP2 :	récepteur prostaglandine E-2
EP3 :	récepteur prostaglandine E-3
EP4 :	récepteur prostaglandine E-4
HETE :	acides hydroxyéicosatétraenoïques
HPETE :	acide hydroperoxyéicosatétraenoïque
IFN- γ :	interféron gamma
IL :	interleukine
NF- κ B:	nuclear transcription factor-kappaB
NK :	natural killer
PG :	prostaglandine
PGE ₂ :	prostaglandine E ₂
PGHS :	prostaglandine H synthétase
PKC:	protéine kinase C
PLA _{2c} :	phospholipase A ₂ cytosolique
PLA _{2s} :	phospholipase A ₂ soluble

PMA:	phorbol 12-myristate 13-acetate
RE:	réticulum endoplasmique
TGF :	transforming growth factor
Th:	lymphocyte T helper
TNF:	tumor necrosis factor
TPA:	phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate
UV:	ultraviolet
VEGF :	vascular endothelial growth factor

Remerciements

J'aimerais remercier tous ceux qui ont contribué au succès de cette recherche, que ce soit de près ou de loin. Avant tout, je remercie la Dre Monique Doré de m'avoir acceptée en tant qu'étudiante. Sa présence fût d'un grand support, que ce soit professionnel ou personnel. Merci de m'avoir guidée dans tout le déroulement et la compréhension de mes recherches scientifiques.

J'aimerais aussi remercier le Dr Jean Sirois pour sa patience et ses conseils de valeur essentielle; Danielle Rannou et Nadine Bouchard pour les connaissances acquises dans le laboratoire et toute la patience qu'elles ont eu pour faire avancer ma recherche. Je remercie aussi Mélanie Brunelle pour son amitié et toutes les discussions et le temps passé ensemble.

Je tiens aussi à remercier mes parents, qui m'ont permis de persévérer dans mes études et dans tout ce que j'entreprends et qui croient en moi; Lionel qui est toujours présent pour me supporter, m'encourager et me donner son appui dans tout ce que je décide de faire dans ma vie. Ma sœur Audrey et mes amis Marilou, Jean-Sébastien, Véronique, Constance, Amélie, Beth et tous les autres que j'oublie, qui ont su être présents quand j'en ai eu besoin et qui le sont toujours autant.

Finalement, je tiens à remercier la Morris Animal Foundation et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour leur soutien financier.

Introduction

Chez les animaux de compagnie, le cancer est la principale cause de mortalité. Cette maladie atteint la peau davantage que d'autres parties du corps du chien. Il s'avère que chez l'espèce canine, le carcinome spinocellulaire est le cancer de la peau le plus commun après le mastocytome. De plus, le carcinome spinocellulaire représente la tumeur maligne la plus commune au niveau des doigts et la deuxième tumeur la plus courante de la cavité orale chez le chien.

Les prostaglandines (PG), présentes dans les tissus tumoraux, ont intéressé plusieurs chercheurs. Depuis plus de vingt ans, plusieurs recherches portant sur le rôle des prostaglandines ont été effectuées et aujourd'hui, c'est la cyclo-oxygénase (COX) qui est de plus en plus étudiée. Cet enzyme comprend trois formes : la COX-1, la COX-2 et la COX-3. La COX est l'enzyme clé de la biosynthèse des prostaglandines. En général, la COX-1 est exprimée de manière constitutive et elle est présente dans la plupart des tissus, alors que la COX-2 est une forme induite et elle est absente dans les tissus normaux. Sa présence a été démontrée dans plusieurs types de néoplasme, autant chez l'humain que chez les animaux. La COX-2 a, entre autres, été observée dans les carcinomes de l'épithélium de la vessie, les adénocarcinomes prostatiques et les carcinomes spinocellulaires. Elle a également fait l'objet de plusieurs expérimentations *in vivo* et *in vitro*, tant chez les animaux que chez l'humain.

Plusieurs facteurs étiologiques contribuent au développement du cancer de la peau, le plus important étant l'irradiation aux rayons ultra-violets. Cependant, plusieurs agents physiologiques et chimiques peuvent aussi contribuer à la carcinogenèse cutanée. Tous ces facteurs agissent sur l'ARNm et la protéine de la COX-2, affectant ainsi la production de PGs. Pour contrer la maladie, des drogues anti-inflammatoires, sélectives ou non à la COX-2, ont été développées.

Les effets de plusieurs agents régulateurs de la COX ont été rapportés dans les cancers chez les humains. Cependant, l'implication de la COX-2 et des PGs, de même que les effets de certaines drogues anti-inflammatoires sur la croissance cellulaire, n'ont pas encore été rapportés dans les carcinomes spinocellulaires chez l'espèce canine.

Recension de la littérature

1. Le carcinome spinocellulaire (CSC)

1.1 Les kératoses actiniques

Les kératoses actiniques sont des lésions extrêmement communes de la peau des personnes caucasiennes exposées au soleil (Salasche, 2000). Une prédisposition génétique et l'exposition au soleil sont des facteurs de risque importants. De plus, l'âge, le sexe, la race, le lieu de naissance, l'origine ethnique et le type de peau peuvent influencer le développement de kératoses actiniques. La kératose actinique est le facteur de risque le plus important identifiant les personnes qui sont les plus prédisposées au développement d'un carcinome spinocellulaire (CSC). Cependant, ce ne sont pas toutes les kératoses actiniques qui progressent en CSC invasif. Le facteur le plus important dans cette transformation semble l'âge, démontré par une augmentation de la prévalence chez les individus d'âge avancé (Salasche, 2000).

1.2 L'épidémiologie et la pathogénie du CSC chez l'humain

Le CSC représente une des tumeurs malignes les plus communes chez l'humain, soit environ 20% de la totalité des cancers de la peau. Cette forme de cancer peut se développer sur différentes régions du corps. Aux États-Unis, le CSC de la tête et du cou représente une cause importante de mortalité, affectant plus de 40,000 individus par année (Greenlee et al., 2000).

Les CSC sont observés plus particulièrement chez les sujets âgés (50-60 ans). Ce type de cancer a une évolution rapide et un pouvoir envahissant local, régional et général important. Ils peuvent se localiser sur les muqueuses (lèvre inférieure), le cuir chevelu, le pavillon de l'oreille et les extrémités : mains, pieds, avant-bras, poignets, organes génitaux.

Une exposition chronique au soleil représente un facteur étiologique important causant le cancer de la peau. Les tumeurs produites par l'exposition de la peau aux rayons ultra-violet (UV) constituent environ 50% des cancers diagnostiqués chez les humains aux Etats-Unis. Il est estimé qu'environ 90% des nouveaux cas de cancers de la peau sont attribuables aux irradiations UV (Rowe et al., 1992). Les UVB seraient des promoteurs et initiateurs de tumeurs (Marks, 1995)

Le gène p53, qui est le gène suppresseur de tumeurs muté le plus souvent, a un rôle important dans le développement du CSC. Le p53 mutant est exprimé dans 90% des cas de CSC, alors qu'il est présent dans 50% des cancers du sein, du poumon et du côlon (Leffell, 2000).

1.3 L'épidémiologie et la pathogénie du CSC chez le chien

Le CSC est souvent diagnostiqué chez les chiens (Greenlee et al., 2000). La prévalence de la tumeur augmente avec l'âge de l'animal, sans prédilection de race. La moyenne d'âge des chiens affectés par la maladie est de 8.4 ans (Reeve et DeForest, 1988). Ce type de carcinome provient de l'épiderme (peau) ou d'une muqueuse, principalement de la cavité buccale (Buckman et al., 1998). Les CSC peuvent se développer dans une grande variété de sites anatomiques, avec une prédilection pour les doigts, la face et l'abdomen (Kraegel et Madewell, 2000). À l'exception des CSC des doigts, les tumeurs se développent dans la peau sans pigmentation ou légèrement pigmentée, telles les régions abdominale et inguinale. Le CSC est la tumeur digitale la plus fréquemment rapportée et cette forme de CSC semble affecter

davantage les chiens de grande race à pelage noir, tels les labrador retrievers et les caniches standards (O'Brien et al., 1992). Cette tumeur implique souvent un seul doigt, mais des CSC primaires multiples impliquant l'épithélium du lit unguéal de plusieurs doigts ont aussi été observés (O'Brien et al., 1992). Les tumeurs présentes dans le lit unguéal ont un comportement particulièrement agressif avec une forte incidence de métastases aux noeuds lymphatiques régionaux. Lors de CSC impliquant plusieurs doigts, ceux-ci peuvent être diagnostiqués en même temps ou à des années d'intervalle (O'Brien et al., 1992)

La cavité orale semble être le site d'origine le plus commun pour le développement d'un CSC (Goldschmidt et Shofer, 1992). Les CSC oraux peuvent s'originer des lèvres, de la gencive, de la langue, des amygdales ou de la muqueuse buccale (Dhaliwal et al., 1998). La gencive est un site fréquent pour le CSC, mais le CSC est plus agressif au niveau des amygdales. Finalement, le CSC peut aussi se développer dans l'œil (Latimer et al., 1987), le pelvis rénal (Dagli et al., 1997) ou le poumon (Aydin et al., 1997).

Une association entre les UV, la dermatose solaire et le CSC chez le chien a été suggérée par une étude démontrant que les chiens exposés à long terme à des radiations présentent un risque élevé pour le développement de dermatose solaire ou de CSC (Nikula et al., 1992). Dans cette étude, 37% des chiens étaient atteints de dermatose solaire et 13% des chiens atteints de CSC avaient préalablement une dermatose solaire. Une forte corrélation a pu être établie entre l'occurrence de certains types de tumeurs et de dermatoses solaires au niveau de la peau non pigmentée de l'abdomen. De plus, l'exposition du corps entier à des rayons gamma a été faite chez des animaux en période prénatale ou jusqu'à un an d'âge. Les résultats ont révélé un risque accru pour le développement d'hémangiosarcomes et de CSC chez les chiens avec une dermatose solaire et ayant été exposés à des rayons gamma jusqu'à l'âge d'un an (Nikula et al., 1992).

2. La cyclo-oxygénase (COX)

2.1 La cascade de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique (AA) se retrouve dans la couche bilipidique de la membrane cytoplasmique de la cellule. Il s'agit d'un acide gras non-saturé de 20 carbones. Le métabolisme de l'AA commence par son détachement de la membrane par des phospholipases, la phospholipase-A₂ cytosolique (PLA_{2c}) et la phospholipase-A₂ soluble (PLA_{2s}) (Hamberg et Samuelsson, 1967). La PLA_{2s} permet l'hydrolyse de la liaison ester d'un phospholipide. Ensuite, la PLA_{2c} permet la libération de l'AA à partir de la membrane phospholipidique dans le cytoplasme. De récentes études ont révélé que la PLA_{2c} permet aussi la prolifération des cellules par le biais de protéines kinases activant la mitogénèse et/ou de protéine kinase C (Bornfeldt et al., 1997).

Une fois libéré, l'AA est un substrat pour trois voies enzymatiques distinctes (Capdevilla et al., 2000) (Figure 1). La première voie est celle de la lipoxygénase qui permet la synthèse de leukotriènes. La deuxième voie, celle de la cyclo-oxygénase (COX), permet la formation de PGs (synthèse de prostanoides). La COX, aussi connue sous le nom de prostaglandine endoperoxyde synthétase (PGHS), comprend trois isoformes : la cyclo-oxygénase-1 (COX-1), la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et la cyclo-oxygénase-3 (COX-3). Finalement, la troisième voie est celle de la monooxygénase du cytochrome P-450 (Capdevilla et al., 2000).

La synthèse de prostanoides se fait par conversion de l'AA en prostaglandine H suite à l'activité enzymatique de la cyclo-oxygénase. Il y a ensuite production de prostaglandine E (PGE) et d'autres prostanoides (Hamberg et Samuelsson, 1967). La conversion de l'AA en prostaglandine H (PGH) est un processus qui nécessite deux étapes: la cyclooxygénation et la peroxydation (Needleman et Isakson, 1998 ; Marnett et al., 1999). Lors de la première étape, l'AA est converti en prostaglandine G₂ (PGG₂), qui est

ensuite convertie en prostaglandine H_2 (PGH_2), le précurseur commun servant à la synthèse de tous les prostanoides, par le site peroxydase de l'enzyme. L'intermédiaire PGH_2 est alors converti par des synthétases en trois groupes de prostanoides cycliques : les prostacyclines (PGI_2), les thromboxanes (TXA_2) et les prostaglandines (PGs).

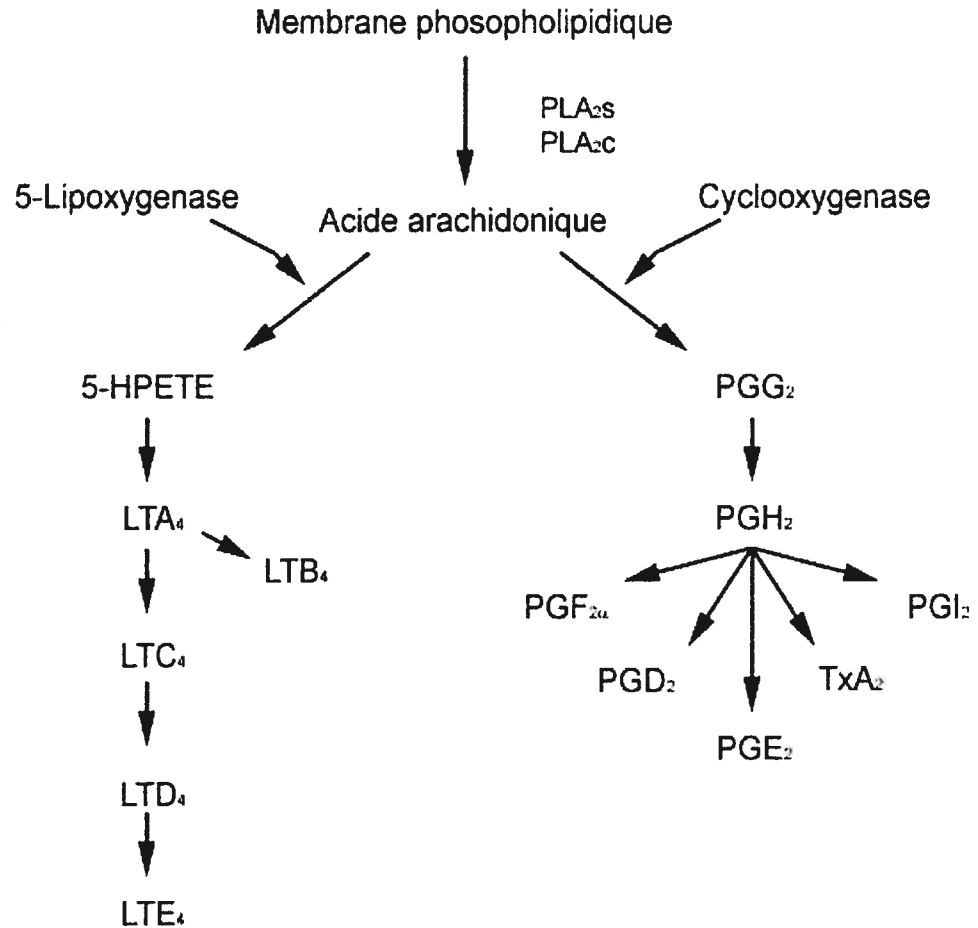


Figure 1. Cascade de l'acide arachidonique. HPETE, acide hydroperoxyeicosatétraénoïque ; LT, leucotriène ; PG, prostaglandine ; TxA_2 , thromboxane (Tizard, 1996).

2.2 Les isoformes de la COX

La COX est un homodimère composé de deux sous-unités d'environ 70,000 daltons et d'un groupe hème (van der Ouderaa et al., 1979). Ses trois formes sont la COX-1, la COX-2 et la COX-3. Elles sont des protéines membranaires intégrales et leurs interactions avec la couche bilipidique impliquent un domaine de liaison membranaire unique (Smith et al., 1996 ; Williams et DuBois, 1996).

Les gènes codant pour la COX-1 et la COX-2 humaines comportent 61% d'homologie au niveau des séquences d'acides aminés, soit environ 604 acides aminés (Picot et al., 1997 ; Kurumbail et al., 1996 ; Hla et Neilson K., 1992 ; Subbaramaiah et al., 1997b). Les deux isoformes consistent en sous-unités comprenant un domaine catalytique relié par un domaine de liaison membranaire à un domaine EGF (epidermal growth factor). Chaque domaine catalytique a un site cyclo-oxygénase actif et, séparé par un groupe hème, un site actif peroxydase (Marnett et al, 1999). Cependant, les deux enzymes proviennent de gènes différents et sont codés par des ARNm de tailles différentes. Ces différences expliquent les effets distincts de différents inhibiteurs de ces enzymes (Smith et al., 1996).

De plus, les protéines de la COX-1 et de la COX-2 montrent des similarités structurales et enzymatiques et elles ont une structure cristalline presque identique (Picot et al., 1997 ; Kurumbail et al., 1996).

2.2.1 La COX-1

La COX-1 est exprimée de manière constitutive dans les tissus humains, tels l'estomac, les plaquettes, les reins et le système nerveux central (Williams et al., 1999 ; Capdevilla et al., 2000 ; Loll et al., 1995). Dans la peau normale, elle est aussi exprimée de manière constitutive dans toutes les couches de l'épiderme et dans les cellules endothéliales des petits vaisseaux sanguins du derme (Müller-Decker et al., 1999).

La COX-1 sert de médiateur aux réponses physiologiques demandant une biosynthèse rapide et/ou constante de PGs (Masferrer et al., 1994 ; Herschman, 1996). Elle a des fonctions de maintien primaire au niveau des cellules, telles la cytoprotection gastrique, la régulation du flot sanguin rénal et l'agrégation des plaquettes (Herschman, 1996 ; Smith et al., 1996).

Le gène codant pour la COX-1 est localisée dans la région chromosomique 9q32-q33.3 chez l'homme (Vane et al., 1998). Son activité enzymatique se fait principalement dans le cytoplasme (Morita et al., 1995).

2.2.2 La COX-2

La COX-2 est normalement absente mais son expression peut être induite par une grande variété d'agents, incluant les agents inflammatoires et les mitogènes (Herschman, 1996 ; Seibert et al., 1994). Elle est impliquée dans l'inflammation, la régulation de la croissance cellulaire, l'angiogénèse, l'apoptose et l'implantation du blastocyte (Loll et al., 1995 ; Fischer, 1997).

La COX-2 est davantage concentrée en surface de l'enveloppe nucléaire et son activité enzymatique se fait dans le cytoplasme et en surface du noyau (Morita et al., 1995). La COX-2 est localisée dans la région chromosomique 1q25.2-q25.3 chez l'homme (Vane et al., 1998). Le gène COX-2 renferme une région qui régule la traduction de son ARNm, ce qui est différent du gène COX-1. La COX-2 est encodée par un ARNm de 4.0 kb, alors que celui de la COX-1 est de 2.8 kb (Vane et al., 1998). La COX-2 peut être stimulée par différents signaux dans divers types de cellules. Ceci pourrait être expliqué par les différentes inductions de plusieurs types d'amplificateurs et d'inhibiteurs de cette région étendue du gène. De plus, la COX-2 peut être induite par des facteurs physiques et chimiques qui ont lieu durant l'inflammation ou des dommages cellulaires (Hla et al., 1999). Les promoteurs tumoraux, les cytokines pro-inflammatoires comme le transforming growth factor beta (TGF- β), les lipopolysaccharides et les facteurs de croissance (tel le EGF) peuvent réguler l'expression de la COX-2

au niveau de la transcription et de la post-transcription. L'EGF et le TGF- β induisent la COX-2 et sont donc de ce fait, considérés comme des inducteurs possibles de COX-2 dans la carcinogénèse.

De plus, la région du promoteur de COX-2 contient des sites de liaison pour le nuclear transcription factor-kappaB (NF- κ B), l'élément de réponse de l'AMPc (CRE), les éléments de réponses de TGF- β et les motifs du facteur nucléaire IL-6 (Chen et al., 1999). Le NF- κ B régule d'ailleurs l'expression de plusieurs gènes cellulaires impliqués dans la réponse au stress, l'apoptose et la réplication virale (Perkins, 1997). Il consiste en un dimère formé de cinq sous-unités et, après activation, est transféré du cytoplasme au noyau où il se lie à l'ADN.

Tableau I. Sommaire des propriétés de la COX-1 et la COX-2 (adapté de Valentich et al., 1995).

	COX-1	COX-2
Régulation	Constitutive	Inductible
ARNm, kb	2.8	4.0
Protéine, kD	68	68
Sites d'expression	Plaquettes, rein, côlon, la plupart des tissus	Cerveau, cellules tumorales, cellules et tissus après stimulation avec cytokines, facteurs de croissance et substances oncogènes
Niveau d'expression du gène induit	Peut augmenter de 2 à 4 fois	Peut augmenter de 10 à 80 fois
Temps de l'activation du gène	24 heures	0.5 à 4 heures
Taille du site actif	Petit	Grand
Effet de l'aspirine sur l'activité	Inhibée	Inhibée

2.2.3 La COX-3

Une troisième isoenzyme, la COX-3, a récemment été découverte (Chandrasekharan et al., 2002). La COX-3 provient du gène de la COX-1, mais conserve l'intron 1 dans son ARNm. Une étude a démontré que l'ARNm de la COX-3 est exprimé dans le cortex cérébral canin (Chandrasekharan et al., 2002). Chez l'humain, l'ARNm de la COX-3 est exprimé sous la forme d'un transcript d'approximativement 5.2 kb et est plus abondant dans le cortex cérébral et dans le cœur. Cet enzyme possède une activité cyclo-oxygénase dépendante de la glycosylation. Une comparaison entre l'activité de la COX-3 canine et les COX-1 et -2 murines démontre que la COX-3 est sélectivement inhibée par des médicaments analgésiques/antipyrétiques comme l'acétaminophène, la phénacétine, l'antipyrine et la dipyronne, et est inhibée fortement par quelques médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (Chandrasekharan et al., 2002).

2.3 Les agents régulateurs de la COX-2

Le tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) augmente l'induction de la COX-2 au niveau des ulcères gastriques (Perkins et Kniss, 1997 ; Takahashi et al., 1998). L'ajout de TNF- α n'influence toutefois pas l'expression de l'ARNm de la COX-1 ni de sa protéine. Il a également été démontré que le TNF- α agit comme un promoteur endogène tumoral. Il coactive la transcription de NF- κ B au niveau des cellules cancéreuses, ce qui permet de limiter l'apoptose (Basu et al., 1998). Une autre étude révèle que le TNF- α stimulerait la synthèse de protéines anti-apoptotiques qui provoquent une résistance à l'apoptose des cellules gastriques cancéreuses (Ueda et al., 2003). Comme le TNF- α est un activateur de la transcription de NF- κ B, cette étude a permis d'affirmer que cette synthèse de protéines anti-apoptotiques était en corrélation avec le NF- κ B.

Le TGF- β est un régulateur puissant de l'expression de la COX-2 (O'Mahony et al., 1999). Une coopération entre ce régulateur et la COX-2 est présente dans le processus de la carcinogénèse et tous les deux sont abondants dans les cellules cancéreuses. De plus, leur expression est plus élevée dans les tumeurs primaires que les métastases et le TGF- β est impliqué dans la croissance tumorale et sa quantité augmente avec l'agressivité de la tumeur (O'Mahony et al., 1999).

Les agents régulateurs de la COX-2 incluent aussi l'interféron- γ (IFN- γ), qui est une cytokine pro-inflammatoire produite principalement par les lymphocytes T activés et les cellules NK (natural killer). Il affecte une grande variété de processus cellulaires, dont la croissance et la différenciation de kératinocytes épidermiques en culture (Nickoloff, 1991 ; Saunders et Jetten, 1994 ; Nickoloff et al., 1989). L'IFN- γ induit l'expression de la COX-2 et augmente la production de PGE₂ par les kératinocytes humains normaux (Matsuura et al., 1999). Il est d'ailleurs impliqué dans plusieurs maladies inflammatoires de la peau, tel le psoriasis (Nickoloff, 1991 ; Fierlbeck et al., 1990). Cependant, contrairement à leur effet sur les cellules normales, l'IFN- γ et le TGF- α seraient moins efficaces pour induire l'expression de la COX-2 dans les CSC, ce qui suggère la présence d'altérations dans les voies de signalisation du TGF- α et de l'IFN- γ dans les kératinocytes tumoraux. En effet, la stimulation de la production de TGF- α et possiblement d'autres cytokines par l'IFN- γ et l'augmentation subséquente de la production de PGE₂ sont probablement des signaux importants permettant de déclencher un état hyperprolifératif suite à des maladies inflammatoires dans la peau.

Finalement, le facteur de croissance épidermique (EGF) augmente le niveau de protéines et d'ARNm de la COX-1 et de la COX-2 (Banny et Kennedy, 1997). Il a été démontré que l'EGF stimule aussi la production de PGE₂ et permet d'augmenter la libération d'AA venant de la membrane lipidique en augmentant l'expression de la PLA_{2c} (Radinsky et al., 1995).

3. Les prostaglandines et le cancer

Les PGs sont divisées en quatre groupes : les PGE, les PGF, les thromboxanes (TXA₂) et les prostacyclines (PGI₂) (Hamberg et Samuelsson, 1967). Les cellules endothéliales possèdent les enzymes permettant la génération des prostacyclines, alors que les enzymes générant les thromboxanes se trouvent dans les plaquettes. Les autres prostaglandines peuvent être synthétisées dans la plupart des cellules nucléées (Tizard, 1996). Les activités biologiques des PGs varient beaucoup : les PGF_{2α} et les TXA₂ provoquent une vasoconstriction en induisant la contraction de muscles lisses, alors que les PGE et les PGI₂ causent une vasodilatation. Les PGI₂, PGE₁ et PGF_{2α} peuvent inhiber l'agrégation plaquettaire, contrairement aux PGE₂ et TXA₂ qui la provoquent (Tizard, 1996).

Les PGs jouent un rôle important dans le développement et la progression de certaines formes de cancer (DuBois et al., 1998). Elles jouent aussi un rôle important dans l'induction des processus inflammatoires de l'épiderme et dans le contrôle de la prolifération et la différenciation des kératinocytes (Fischer, 1997 ; Konger et al., 1998 ; Leong et al., 1996). Les PGs agissent donc à différents niveaux de la transformation maligne, incluant la suppression de la réponse immunitaire, la stimulation de la croissance cellulaire et l'implication dans la promotion de la tumeur (ElAttar, 1985 ; Kupper, 1990 ; Fischer, 1997 ; Jeng et al., 2000). Une stimulation de la production de PGs peut être expliquée partiellement par la surexpression de l'ARNm de la COX-2 (Jeng et al., 2000). De plus, la baisse rapide du métabolisme des PGs suggère qu'elles puissent agir comme des facteurs autocrines ou paracrines afin de moduler l'action ou la synthèse d'autres messagers secondaires. Il est d'ailleurs bien établi que les PGs majeures se lient à des types de récepteurs spécifiques.

La PGE₂ est le produit majeur de la COX-2. Ceci a pu être démontré par des expériences incluant des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 (Celecoxib) qui permettent la réduction de la synthèse de PGE₂ et l'inhibition

significative du développement tumoral cutané dû à des irradiations aux UV (Fischer et al., 1999). Une autre étude *in vitro* suggère que la PGE₂ est un autacoïde provoquant la tumeur au niveau de l'épiderme et que la synthèse régulée de PGE₂ est importante dans la guérison de certaines plaies (Rys-Sikora et al., 2000).

La PGE₂ peut se lier à quatre récepteurs de surface, soit EP1, EP2, EP3 et EP4, qui modulent directement les niveaux intracellulaires d'AMPc (Snijdwint et al., 1993 ; Negishi et al., 1993 ; Konger et al., 1998). Ces récepteurs sont couplés à une protéine G et comprennent sept domaines transmembranaires. Le mécanisme permettant l'interaction entre la PGE₂ et les récepteurs n'est pas bien élucidé, mais des études ont permis de reconnaître qu'il est dépendant de l'expression, de l'activation et de l'affinité de la liaison des récepteurs de surface (Cao et Prescott, 2002). La PGE₂ peut moduler la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T humains et sert aussi de médiateur de la douleur aux sites inflammatoires (Snijdwint et al., 1993).

3.1 Les prostaglandines et la croissance tumorale

De récentes études ont permis de démontrer que la COX-2 jouait un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire. La croissance des cellules du carcinome du poumon est augmentée rapidement lorsqu'elles sont implantées dans des souris hôtes (Williams et al., 2000). Cette croissance tumorale est fortement atténuée chez les souris COX-2^{-/-}, contrairement aux souris COX-1^{-/-}. Ceci suggère que l'expression de la COX-1 chez l'hôte n'est pas essentielle à la croissance tumorale, alors qu'il existe un rôle important pour la COX-2 chez l'hôte dans la promotion de la croissance de la tumeur (Williams et al., 2000). Ensuite, Higashi et al. (2000) ont démontré que des lignées cellulaires cutanées tumorales qui se retrouvent en présence d'oligonucléotides antisens COX-2 montrent une

suppression de l'expression de la COX-2 et de la croissance cellulaire. Par exemple, la PGE₂ permettrait la prolifération cellulaire (Sheng et al., 1998), stimulerait l'angiogénèse (Tsuji et al., 1998) et inhiberait l'immunosurveillance dans les cancers chez les humains.

L'angiogénèse est une composante clé dans le développement et la croissance des tumeurs. L'expression du vascular endothelial growth factor (VEGF) joue un rôle important dans l'angiogénèse, la croissance tumorale et les métastases (Benjamin et Keshet, 1997). Une augmentation de la masse cancéreuse peut être précédée par une augmentation de l'apport sanguin, donnant ainsi des nutriments et de l'oxygène à la tumeur (Folkman, 1990). Plusieurs études ont permis de faire un lien entre la COX-2 et le VEGF. Parmi celles-ci, Williams et al. (2000) ont montré que la croissance tumorale est atténuée chez les souris déficientes en COX-2 comparée à celles déficientes en COX-1. Une diminution de la densité vasculaire a été observée dans des tumeurs chez les souris déficientes en COX-2. De plus, une surexpression de la COX-2 induit les niveaux de l'ARNm et de la protéine VEGF, ce qui suggère que la COX-2 permet la progression tumorale en induisant l'angiogénèse (Fujita et al., 2002 ; Gallo et al., 2001).

Une étude faite par Nishimura et al. (1999) chez les souris a démontré l'effet d'un inhibiteur sélectif de la COX-2, le JTE-522, sur le carcinome spinocellulaire de la tête et du cou. Le JTE-522 induit une augmentation de la phase G1. Une suppression de l'angiogénèse à la périphérie de la tumeur et de l'activité télomérase a été démontrée, de même qu'une augmentation de l'apoptose au niveau de la tumeur. Le JTE-522 a donc un effet anti-tumoral et une action anti-angiogénique.

Lors de la croissance de cellules tumorales dans les poumons, le niveau de PGE₂ augmente (Young et Knies, 1984). L'administration de PGE₂ exogène et d'indométhacine par voie orale ont un effet opposé sur la fréquence de la formation de tumeurs, leur croissance et sur les métastases. La PGE₂ permet d'augmenter le comportement agressif de la tumeur, alors que l'indométhacine a comme effet de le réduire. Donc, l'utilisation

d'indométacine ou d'aspirine permet de retarder la croissance cellulaire dans les tumeurs en général *in vitro* et de bloquer l'immunosuppression chez les cellules *in vivo* (Plescia et al., 1976).

3.2 Les prostaglandines et l'apoptose

L'apoptose est définie comme un processus physiologique permettant la mort cellulaire et qui est nécessaire au fonctionnement corporel normal (Tizard, 1996). Il s'agit en effet d'une mort cellulaire programmée. Elle peut être déclenchée par plusieurs facteurs, comme des micro-organismes. Elle peut cependant diminuer lors de la carcinogénèse et être inhibée par la COX-2 (Tsuji et DuBois, 1995 ; Scorrano et al., 2001). Une telle inhibition peut alors causer une accumulation de cellules mutées et une prolifération cellulaire anormale. De plus, une forte activité de la COX-2 peut entraîner une baisse de la concentration intracellulaire d'AA, ce qui bloque la voie des caspases, responsables de l'apoptose (Scorrano et al., 2001).

La PGE₂ produite suite à la surexpression de la COX-2 peut causer une diminution de la quantité des protéines pro-apoptotiques Bax et Bcl-x (Battu et al., 1998). La PGE₂ permet aussi l'induction de l'expression de bcl-2, causant ainsi l'inhibition de l'apoptose (Zimmermann et al., 1999) et une augmentation de la transcription de la COX-2 (Tjandrawinata et al., 1997). De plus, la liaison entre la PGE₂ et le récepteur EP2 permet la suppression de l'apoptose. Ceci a été démontré par une étude utilisant des agonistes des récepteurs EP (Goetzl et al., 1995b). En effet, des agonistes spécifiques aux récepteurs EP2 et EP3 inhibent l'apoptose induite par des agents apoptotiques, alors que des agonistes spécifiques aux récepteurs EP1 et EP4 n'ont pas d'effets significatifs sur l'apoptose. Il semble que l'AMPc est le médiateur principal de la suppression de l'apoptose par la PGE₂ (Goetzl et al., 1995b). L'AMPc seule est considérée comme étant un stimulus pour l'apoptose des lymphocytes T dans plusieurs cas (Lee et al., 1993). Ceci a

été testé avec un inhibiteur de l'activité phosphodiesterase de l'AMPc. L'inhibiteur seul inhibe faiblement l'apoptose induite par des agents apoptotiques dans les thymocytes, alors que cette inhibition est fortement augmentée en présence de PGE₂ (Goetzl et al., 1995b).

Une expression élevée de COX-2 provoque une inhibition de l'apoptose dans les entérocytes *in vitro* (Fischer, 1997). En effet, les entérocytes transfectés de façon permanente avec un vecteur de l'expression de la COX-2 sont résistantes à l'apoptose (Tsujii et DuBois, 1995 ; Battu et al., 1998). Les mécanismes impliqués dans cette inhibition de l'apoptose peuvent inclure un effet sur une nucléobindine, une protéine associée à l'apoptose, ou la modulation de l'AA intracellulaire (Subbaramaiah et al., 1997b).

De plus, la kinase sérine/thréonine Akt (protéine kinase B) est un régulateur de la survie cellulaire et de l'apoptose. Son activation permet de protéger une variété de cellules contre l'apoptose. Hsu et al. (2000) ont d'ailleurs démontré que le Celecoxib permettait l'induction de l'apoptose en bloquant l'activation de l'Akt anti-apoptotique dans les cellules cancéreuses de la prostate, suite à une action indépendante de Bcl-2.

3.3 Les prostaglandines et la réponse immunitaire

Afin de déterminer l'importance de la PGE₂ provenant de cellules cancéreuses dans les défenses immunitaires, les patients atteints de carcinomes spinocellulaires de la tête et du cou ont été traités avec de l'indométacine (Cross et al., 1992). L'indométacine, un inhibiteur non-sélectif de la COX, permet d'augmenter significativement le nombre de lymphocytes CD2+ s'infiltrant dans les tumeurs lorsqu'il est administré chez des patients atteints de carcinomes spinocellulaires de la tête et du cou. Ce traitement inhibant la synthèse de PGs a permis d'augmenter les lymphocytes T CD4+ et CD8+ circulant. La PGE₂ a donc des effets sur les sous-populations des cellules T. Elle peut influencer la sous-population des cellules CD4+, soit les

Th1 qui sont critiques pour la défense anti-tumorale. Les Th1 sécrètent l'IL-2 et l'IFN- γ et sont plus sensibles aux effets inhibiteurs de la PGE₂ que les Th2 (Li et Fox, 1993). La PGE₂ bloque la sécrétion de lymphotoxines (TNF- β) et TNF- α par les cellules T. Le degré dont la PGE₂ module la fonction des cellules T dépend de son effet sur les sous-populations de cellules T, mais aussi du niveau d'activité de ces cellules. Les cellules CD8⁺ activées ont une sensibilité accrue aux effets inhibiteurs de la PGE₂, en comparaison aux autres cellules CD8⁺ (Sunder-Plabmann et al., 1991).

Lors d'une inflammation ou d'une réponse immunitaire, les cellules accessoires, tels les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques, peuvent stimuler la sécrétion de PGE₂ par la rate ou les nœuds lymphatiques en réponse à un agent, par exemple le TNF (Phipps et al., 1991). Il a d'ailleurs été démontré que la PGE₂ est un puissant régulateur de certaines fonctions des lymphocytes B. Les effets de cette prostaglandine sur ce type de cellule sont divers et peuvent inclure la sous-régulation de la synthèse de IgM (Roper et Phipps, 1992). De plus, la PGE₂ exerce ses effets sur les lymphocytes B via les récepteurs membranaires couplés à une protéine G qui sont liés à une variété de systèmes de signalisation intracellulaire (Narumiya et al., 1993).

De plus, la PGE₂ possède des effets immunosuppresseurs indirects. Elle permet aux cellules cancéreuses de perturber le système immunitaire de l'hôte. Plescia et al. (1975) ont démontré qu'une souris ayant un cancer devenait fortement immunosupprimée lors de la croissance de la tumeur.

4. Les médicaments anti-inflammatoires

4.1 Les inhibiteurs non-sélectifs de la COX-2

La COX-1 et la COX-2 sont les cibles de nombreux médicaments anti-inflammatoires (Figure 2). Il existe deux types de médicaments anti-inflammatoires : les stéroïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINSs).

Parmi les stéroïdes, il y a la dexaméthasone et l'actinomycine D. La dexaméthasone permet de réprimer la transcription de la COX-2 induite par l'IL-1 β , par exemple dans les cellules pulmonaires A549 humaines (Newton et al., 1998). L'actinomycine D réprime les protéines de la COX-2, de même que l'activité et la synthèse de PGE₂ (Newton et al., 1998).

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINSs) permettent de bloquer le site actif de la COX. Une utilisation à long terme de ces médicaments chez l'humain diminue significativement le risque relatif de certains types de cancers, notamment le cancer colorectal (Rao et al., 1991). Parmi les AINSs, on retrouve l'aspirine, l'ibuprofène et l'indométhacine. Ces médicaments bloquent la conversion de la COX en s'y liant de différentes façons et en bloquant ainsi son site actif (Bjorkman, 1996 ; Hida et al., 1998a). À des concentrations thérapeutiques, les AINSs peuvent bloquer l'induction par l'IL-1 β et le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) du gène de la COX-2 et l'expression de la protéine de la COX-2 dans les fibroblastes humains (Xu et al., 1999). L'inhibition de la COX et des PGs est un des mécanismes qui intervient directement dans la cascade de signal nécessaire à la prolifération cellulaire (Marnett, 1992).

L'aspirine est un AINS qui agit de trois façons : elle inhibe la COX-1 et la COX-2, elle inhibe la translocation de NF- κ B au noyau et elle permet l'accumulation d'adénosine, un puissant autacoïde anti-inflammatoire (Egan et al., 1999). L'indométhacine a également une activité inhibitrice de la COX-1 et de la COX-2 et permet de réduire significativement la croissance de

tumeurs cutanées induites chimiquement ou par des radiations avec des UV (Fischer et al., 1999) et de réduire la croissance des carcinomes du cou et de la tête (Panje, 1981). Finalement, le sulindac et son métabolite, le sulindac sulfide, qui réduisent le taux de prolifération cellulaire, changent la morphologie des cellules et induisent l'apoptose, due à l'inhibition de la synthèse de prostanoïdes (Giardiello et al., 1998 ; Lim et al., 1999 ; Nishimura et al., 1999).

Certains effets secondaires sont toutefois associés à l'utilisation prolongée d'AINS non-sélectifs. C'est ainsi que l'inhibition de la COX-1 interfère avec l'hémostase en inhibant l'agrégation plaquettaire. L'inhibition de cet isoforme dans la muqueuse gastro-intestinale cause une diminution de la synthèse des PGs qui servent à la protection de la muqueuse (Vane et Botting, 1997 ; Fosslie, 1998 ; Warner et al., 1999). Cette perte de PGs cytoprotecteurs peut alors entraîner une ulcération, une hémorragie et une perforation du tractus gastro-intestinal. De même, l'inhibition de la synthèse de PGs cytoprotectrices dans le rein pourra entraîner des lésions de nécrose de la papille rénale.

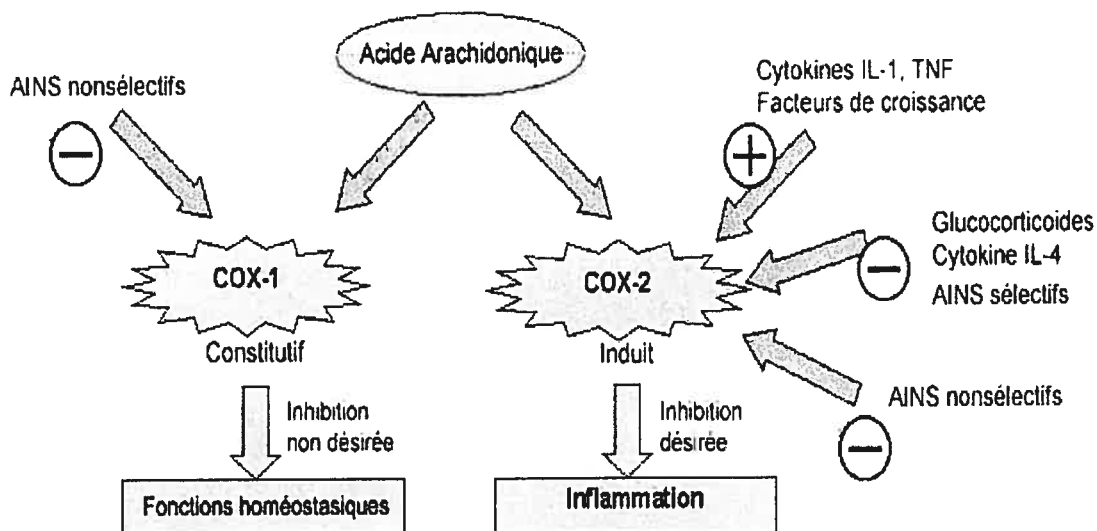


Figure 2. Médicaments agissant sur la COX-1 et la COX-2. Les AINS non sélectifs inhibent la COX-1 et la COX-2, alors que les AINS sélectifs de la COX-2 inhibent seulement celle-ci. (<http://www.opt.pacificu.edu/ce/catalog/>).

4.2 Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2

Afin d'éviter les effets secondaires reliés à l'utilisation des AINSs non-sélectifs, une nouvelle classe de médicaments, les inhibiteurs sélectifs de la COX-2, a été développée (Needleman et Isakson, 1998). Plusieurs études suggèrent que la COX-2 est une cible importante pour la prévention et les traitements du cancer. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2 réduit la formation, la croissance et les métastases de plusieurs types de cancers, incluant le CSC de la tête et du cou et celui du côlon (Kawamori et al., 1998).

Shiotani et al. (2001) ont été les premiers à utiliser les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 afin de prévenir le CSC de la tête et du cou. Ils ont démontré que le traitement avec le nimesulide, un inhibiteur, diminue l'incidence et la prolifération du CSC de la langue chez les rats. D'autres études ont mis en évidence l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques à la COX-2 pour traiter le CSC de la tête et du cou : le JTE-522 a inhibé la croissance de carcinomes de la tête et du cou xénogreffés chez les souris (Nishimura et al., 1999). Plusieurs recherches portent sur l'efficacité des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 sur les polyposes adénomateuses familiales (Kaplan-Machlis et Klostermeyer, 1999 ; Steinbach et al., 2000), les adénomes colorectaux sporadiques et les conditions précancéreuses, telle la leucoplakie orale.

Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 sont considérés comme des agents analgésiques et anti-inflammatoires efficaces. Cependant, pour qu'un inhibiteur sélectif soit considéré comme tel, il doit montrer des bénéfices thérapeutiques au moins aussi bons que ceux des AINSs non sélectifs et il doit aussi permettre une inhibition insignifiante de la COX-1 (Lipsky et al., 1998). Le mécanisme par lequel ces inhibiteurs suppriment la carcinogénèse est attribué à la modulation de la production de prostanoides qui affecte la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire et la réponse immune. Ces inhibiteurs sélectifs inhibent donc l'activité COX sans affecter l'activité peroxidase de la COX-2, alors que la suppression de l'expression de la

COX-2 peut résulter en l'inhibition de ces deux types d'activité (Zimmermann et al., 1999). Leur sélectivité pour la COX-2 varie de faible à forte (Figure 3).

Le Celecoxib est un agent qui inhibe sélectivement la COX-2 (Penning et al., 1997) et qui est très efficace en tant qu'agent anti-inflammatoire. Efficace dans l'inhibition de la carcinogénèse, il permet de diminuer l'incidence des tumeurs colorectales (Kawamori et al., 1998). L'administration de cet inhibiteur chez des souris a réduit la formation de tumeurs cutanées, tels les CSC, induites par des carcinogènes (Pentland et al., 1999). Cette administration a diminué le nombre de tumeurs de la peau et leur taille chez des souris nues irradiées avec des UV (Pentland et al., 1999). Le Celecoxib est également utilisé pour traiter la polypose adénomateuse familiale (Kaplan-Machlis et Klostermeyer, 1999).

Le meloxicam est un inhibiteur sélectif de la COX-2, faisant partie de la classe des énoil-carboxamide (Lazer et al., 1997). Il réduit la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro* et inhibe la croissance des cellules cancéreuses xénogreffées (Sheng et al., 1997).

Le JTE-522 est un inhibiteur de la COX-2 qui supprime la croissance tumorale, ceci ayant été démontré sur des souris thymectomisées injectées avec des cellules de CSC de la tête et du cou de l'humain (Nishimura et al., 1999). Il permet la suppression de la croissance des CSC de la tête et du cou par des mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire, de la suppression de l'activité de la télomérase et de l'induction de l'apoptose.

Le SC-58125 a un haut degré de sélectivité pour la COX-2 (Gierse et al., 1996). Il cause une inhibition de la COX-2 qui est irréversible et dépendante du temps, alors qu'il inhibe la COX-1 de façon réversible. Sa sélectivité est due à la mutagenèse dirigée au niveau du site actif de la COX-2. Il a été établi que la substitution d'un acide aminé sur ce site peut être suffisante pour permettre la sélectivité du SC-58125 à la COX-2 (Gierse et al., 1996). Il inhibe la COX-2, réduit la synthèse de PGE₂, inhibe le Bcl-2 et induit l'apoptose au niveau des carcinomes prostatiques (Liu et al., 1998).

Finalement, le NS-398 est l'inhibiteur sélectif de la COX-2 le plus spécifique pour cet isoforme (O'Neill et al., 1995). Il permet de réduire l'incidence de tumeurs colorectales et supprime toutes les tumeurs induites par l'azoxyméthane (Yoshimi et al., 1997). Il permet l'apoptose et bloque le NF- κ B qui régule l'expression de beaucoup de gènes, incluant celui de la COX-2. Il permet en effet de supprimer la biosynthèse de PGE₂ et la prolifération cellulaire, tout en induisant l'apoptose au niveau des cellules cancéreuses de l'œsophage (Zimmermann et al., 1999) et des cellules des carcinomes oraux (Minter et al., 2003).

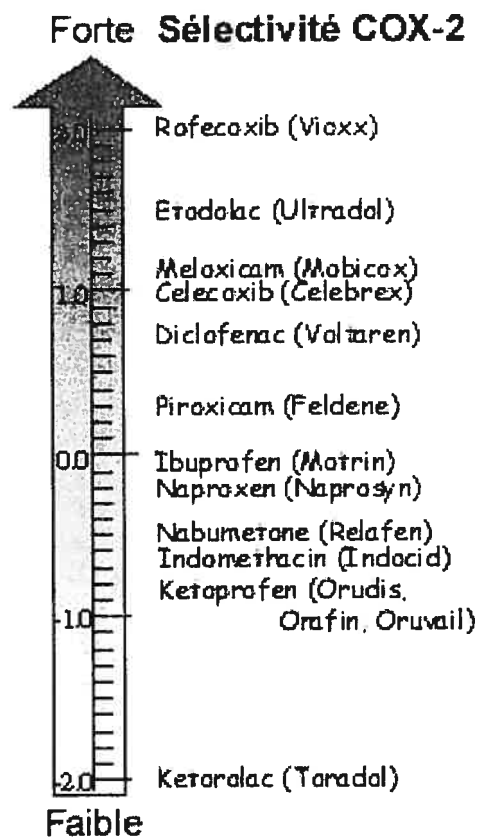


Figure 3. Sélectivité à la COX-2 de certains médicaments anti-inflammatoires (Henry et al., 1996).

5. Évidences du rôle de la COX-2 dans le cancer

La surexpression de la COX-2 a été démontrée dans une variété de néoplasmes humains, incluant les carcinomes colorectaux (Sano et al., 1995 ; Hao et al., 1999 ; Tsujii et DuBois, 1995 ; Oshima et al. ; 1996), pulmonaires (Hida et al., 1998b), gastriques (Murata et al., 1999), mammaires (Parrett et al., 1997) et prostatiques (Yoshimura et al., 2000), de même qu'au niveau des carcinomes des cellules transitionnelles de la vessie et des adénocarcinomes et carcinomes spinocellulaires de l'œsophage et de la tête et du cou (Snyderman et al., 1994 ; Kargman et al., 1995 ; Zimmermann et al., 1999). Son expression est typiquement maximale pendant les premiers stades de différenciation et réplication cellulaire des tissus cancéreux (Fischer, 1997).

Plusieurs évidences provenant d'une grande variété de systèmes expérimentaux ont permis de démontrer l'importance de la COX-2 dans la carcinogénèse. Un haut niveau d'expression de la COX-2 par le carcinome colorectal humain a été associé à l'invasion tumorale profonde, mais pas aux métastases (Fujita et al., 1998). Les effets majeurs de la surexpression de la COX-2 dans la néoplasie sont donc : l'inhibition de l'apoptose par la PGE₂, l'augmentation de la prolifération cellulaire et l'induction de l'haptoglobine par l'IL-6, qui est induite par la PGE₂ (Battu et al., 1998; Subbaramaiah et al., 1997a). L'haptoglobine est une protéine de la phase aiguë qui peut perturber les fonctions immunitaires (Oh et al., 1990) en inhibant la cytotoxicité des lectines (Frantz et al., 2000) et qui est fortement présente chez les personnes cancéreuses.

5.1 Expression de la COX-2 dans les CSC *in vivo* spontanés

La surexpression du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) est un marqueur pronostique défavorable dans le CSC laryngé. Le EGFR stimule l'expression de la COX-2 dans les kératinocytes humains normaux et néoplasiques. L'expression de la COX-2 a été étudiée par Ranelletti et al. (2001) dans les CSC du larynx par immunohistochimie. Les régions différenciées du CSC ont démontré une forte expression de la COX-2, alors que les régions normales aussi bien que les tumeurs faiblement différenciées étaient négatives.

Gallo et al. (2001) ont étudié le rôle de la COX-2 chez 35 patients atteints du CSC de la tête et du cou. Ils ont étudié l'expression de la COX-2 et la synthèse de la PGE₂, l'angiogénèse de la tumeur et les métastases aux noeuds lymphatiques. L'expression de l'ARNm et de la protéine de la COX-2 était plus forte dans les échantillons tumoraux que dans les normaux. Les patients présentant des métastases au niveau des noeuds lymphatiques ont démontré une expression plus élevée de la protéine COX-2 et des niveaux de PGE₂ que les patients sans métastases. Cette étude suggère un rôle central de la voie de la COX-2 dans l'angiogénèse des personnes atteintes du CSC de la tête et du cou.

Alors que la peau et la muqueuse orale normales canines n'expriment pas la COX-2, les CSC canins démontrent une surexpression de COX-2 (Pestili de Almeida et al., 2001). Ceci a été démontré par une étude immunohistochimique de 40 chiens atteints par un CSC. L'intensité et l'étendue de la COX-2 variaient selon les tumeurs. Il n'y avait cependant aucune corrélation entre le site, l'étendue et l'intensité de la COX-2. La COX-2 était principalement localisée dans le cytoplasme des kératinocytes néoplasiques, souvent plus concentrée autour de la membrane nucléaire, alors que la COX-1 était faiblement exprimée ou indétectable dans les cellules normales et dans les CSC (Pestili de Almeida et al., 2001).

5.2 Expression de la COX-2 dans les CSC *in vivo* expérimentaux

Parmi les facteurs étiologiques contribuant au cancer de la peau, les rayons UV jouent un rôle important. Les kératinocytes humains irradiés avec des rayons UVB (290-320 nm) présentent une mutation des cytosines (C) en thymines (T), particulièrement lorsque deux cytosines sont adjacentes ou lorsqu'une cytosine est adjacente à une thymine. Aucun autre agent carcinogénique n'est connu pour ce type de mutation (Leffell, 2000).

Selon Gresham et al. (1996), les UVB augmenteraient la formation de PGs pro-inflammatoires, formation due à l'augmentation de l'activité de la phospholipase, qui favorise la disponibilité de l'AA (Isoherranen et al., 1999). Une exposition aux UV résulte donc en une surexpression de la COX-2 suggérant que celle-ci est impliquée dans le développement de la tumeur de la peau suite à une exposition prolongée au soleil (Buckman et al., 1998). Dans leur étude, Buckman et al. ont déterminé l'effet de l'irradiation avec des UVB sur la synthèse de PGs par des kératinocytes humains. Une augmentation de PGE₂ a été observée peu de temps après l'irradiation et la concentration de PGE₂ a atteint un plateau entre 10 et 24h après l'exposition. Une augmentation de l'activité de la COX-2 et de la production de PGs a été obtenue avec les kératinocytes de différents individus (Buckman et al., 1998). Ainsi, une forte augmentation des protéines de la COX-2 dans les cellules du CSC était présente comparativement à la peau non exposée au soleil, ce qui suggère qu'une irradiation aux UV induit la synthèse de COX-2 (Buckman et al., 1998).

Une autre étude avec des kératinocytes humains indique que les UVB induisent l'expression de la COX-2 en affectant ses protéines et son ARNm, les kinases MAP p38 jouant un rôle majeur dans ce processus (Reddy et al., 1993). De plus, l'exposition aux UV supprime les réactions immunitaires cellulaires. Un des mécanismes potentiels pouvant expliquer cet effet est l'influence sur l'activation des cellules T. En effet, Shreedhar et al. (1998) suggèrent que la PGE₂ relâchée par les kératinocytes irradiés aux UV

(Pentland et al., 1990), active la cascade de cytokines impliquant l'IL-4 et l'IL-10. L'IL-4 est une cytokine qui permet la différenciation des cellules Th2, alors que l'IL-10 permet davantage celle des Th1. L'IL-10 peut influencer l'activation des cellules Th1 en altérant la présentation des antigènes et en supprimant la sécrétion de l'IFN- γ (Fiorentino et al., 1991). De plus, l'IL-10 est un médiateur essentiel pour la suppression du système immunitaire. Le traitement de souris irradiées avec des anticorps anti-IL-10 a permis de bloquer l'immunosuppression (Rivas et Ullrich, 1992). Un certain nombre de facteurs modulateurs de la réponse immunitaire, incluant le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10 et le PGE₂, sont sécrétés par les kératinocytes irradiés avec des UV et peuvent être retrouvés dans le sérum des souris ayant été exposées à ces rayonnements (Ullrich, 1995 ; Yarosh et al., 2000). L'IL-4 est également impliquée dans la suppression de la réponse immune suite à une telle exposition (Shreedhar et al., 1998).

L'administration expérimentale d'un inhibiteur sélectif de la COX-2 (ex : Celecoxib) à des souris thymectomisées et irradiées avec des rayons UV a diminué la production de tumeurs de la peau si l'inhibiteur était administré pendant la période de radiation. Si l'inhibiteur était administré suite la photocarcinogénèse, il y avait prévention de nouvelles formations tumorales (Pentland et al., 1999). Ces résultats suggèrent que le traitement avec des inhibiteurs de la COX-2 pourrait être utilisé pour prévenir les tumeurs cutanées induites par les UV.

Afin de comprendre la fonction de la COX-2 dans l'épiderme, un promoteur kératine 5 a été utilisé pour diriger l'expression de la COX-2 dans les cellules basales de l'épiderme interfolliculaire dans la peau de souris transgéniques (Goetzl et al., 1995a ; Neufang et al., 2001). Une augmentation des niveaux de PGs a été alors observée dans l'épiderme et le plasma, montrant ainsi une surexpression de la COX-2 dans les régions prévues. Ces souris transgéniques ont démontré un développement folliculaire retardé, une diminution de la densité des follicules pileux, un

hyperplasie des glandes sébacées ainsi que des foyers d'hyperplasie et de dysplasie de l'épiderme (Neufang et al., 2001).

Une induction de l'hyperplasie épidermique par le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) augmente la quantité de kératinocytes exprimant la COX-2, suggérant ainsi que l'expression de la COX-2 est en relation avec la régénération épithéliale. Des expériences sur des souris traitées avec du TPA ont été faites et ces souris ont développé une réponse pléiotropique impliquant des altérations dans la croissance et la différenciation des kératinocytes et dans l'inflammation cutanée. L'inflammation induite par le TPA semble être associée aux altérations au niveau de la production de cytokines, l'induction de COX-2 épidermique et l'augmentation de la production de certaines PGs et leukotriènes. Ces effets se font par le biais de la protéine kinase C (PKC) (Wang et al., 2001).

5.3 Régulation de la COX-2 dans les kératinocytes *in vitro*

Des études ont été faites en stimulant des kératinocytes humains en culture avec des agonistes, tels l'IFN- γ , le TGF- α ou le TPA, permettant ainsi une induction de protéines ou d'ARNm de la COX-2 (Nishimura et al., 1999 ; Müller-Decker et al., 1998b).

Dans les kératinocytes humains, une corrélation entre la production de PGE₂ et la synthèse de l'ADN a été observée. L'addition exogène de PGE₂ peut empêcher l'inhibition de la prolifération causée par l'utilisation d'indométacine, suggérant ainsi que la PGE₂ est un autacoïde permettant la promotion de la croissance dans l'épiderme (Pentland et Needleman, 1986). Pour parvenir à ces résultats, des cultures de kératinocytes ont été incubées en présence d'AA, ce qui a permis de synthétiser de la PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} et un peu de 6-keto-F1 alpha. Les cultures non confluentes ont synthétisé davantage de PGE₂ que les cultures confluentes et cette augmentation était proportionnelle à l'augmentation de la prolifération. Lorsque la synthèse de

PGE₂ était inhibée avec de l'indométacine, le taux de prolifération des cultures non confluentes a diminué de 40%, alors que la prolifération des cultures confluentes n'a pas changé. Cependant, l'addition de PGE₂, mais non de PGF₂ ou de PGD₂, aux cultures non confluentes traitées à l'indométacine a permis un retour au taux de prolifération initial. Ceci suggère donc que la PGE₂ est un autacoïde permettant la croissance de l'épithélium (Pentland et Needleman, 1986).

Des études récentes ont démontré que l'irradiation de kératinocytes humains cause une surexpression de la protéine COX-2 (Buckman et al., 1998). Les UVB augmentent possiblement l'expression de la COX-2 par leur action sur le gène suppresseur de tumeurs p53. Le gène p53, un régulateur de la croissance et de la prolifération cellulaire, cause une diminution marquée de l'expression de la COX-2 dans les fibroblastes de souris (Subbaramaiah et al., 1999). Ainsi, l'irradiation aux UVB de la peau de souris induit des mutations au niveau du gène p53 et ces formes mutantes dans les tissus malins vont éventuellement contribuer à l'augmentation de l'expression de la COX-2 (Gamblin et al., 1997). Des mutations du gène p53 ont d'ailleurs été rapportées dans des cas de CSC naturels, notamment chez les chiens (Gamblin et al., 1997 ; Teifke et Lohr, 1996).

Des études ont aussi démontré que les kératinocytes épidermaux en culture, dans un milieu avec une forte concentration en calcium (milieu favorisant la différenciation), ont une plus forte expression de COX-2 comparativement aux kératinocytes dans un milieu avec peu de calcium (milieu induisant la prolifération) (Leong et al., 1996). Ces études suggèrent la possibilité que la COX-2 joue un rôle dans la différenciation cellulaire (Leong et al., 1996 ; Fischer, 1997). D'autres études suggèrent une corrélation positive entre l'expression de la COX-2 et la prolifération et la promotion de la tumeur (Müller-Decker et al., 1998a ; Marks et al., 2000). L'administration d'AINS, comme le SC-58125, permet de supprimer la synthèse de PGE₂ par la COX-2. Cette administration permet de retarder la progression des cellules épithéliales malignes.

Par ailleurs, Grewe et al. (1993) se sont intéressés à la synthèse de PGE₂ induite par l'irradiation de kératinocytes humains aux UV. Ils ont plus particulièrement étudié le rôle des cytokines IL-1 et TNF- α . Ces chercheurs ont rapporté que la production de PGE₂ due à l'irradiation peut être inhibée à 70% par un anticorps monoclonal bloquant les effets de l'IL-1. De plus, la synthèse de PGE₂ induite par les UV peut être bloquée à 50% en présence d'anticorps contre le TNF- α et être complètement inhibée avec une combinaison d'anticorps contre l'IL-1 et le TNF- α (Grewe et al., 1993).

Objectif

L'objectif de ce projet était de caractériser la régulation et l'expression de la cyclo-oxygénase-2 dans les kératinocytes canins normaux et cancéreux à l'aide d'un modèle *in vitro*.

Article

**EXPRESSION AND REGULATION OF CYCLO-OXYGENASE-2 IN
NORMAL AND NEOPLASTIC CANINE KERATINOCYTES**

Nadia Pronovost, Maya M. Suter, Eliane Mueller, Jean Sirois, Monique Doré

Expression and Regulation of Cyclo-oxygenase-2 in
Normal and Neoplastic Canine Keratinocytes

Nadia Pronovost*, Maya M. Suter‡,

Eliane Mueller‡, Jean Sirois† and Monique Doré*§

*Département de pathologie et microbiologie, †Centre de recherche
en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6,
and ‡Institute of Animal Pathology, University of Bern, Bern, Switzerland

§To whom all correspondence and reprint requests should be addressed: Dr.
M. Doré, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine
vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec,
Canada J2S 7C6. Phone: 450-773-8521 ext. 8237, Fax: 450-778-8116, E-
mail: monique.dore@umontreal.ca

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma is one of the most common cancers in dogs, yet relatively little is known about the molecular events involved in its development. Increasing evidence implicates cyclo-oxygenase-2 (COX-2) in the pathogenesis of various cancers in humans and animals. COX-2 overexpression has recently been demonstrated in canine squamous cell carcinomas. The objective of our study was to characterize and compare the expression and regulation *in vitro* of COX-2 between normal and cancerous canine keratinocytes. Cell lines derived from normal (CK) and cancerous (SCC) canine keratinocytes were cultured in the absence or presence of agonists, and immunoblots, immunocytochemistry, radioimmunoassays and a cell proliferation assay were used to characterize COX-2 regulation and effects. Results showed that neoplastic keratinocytes had a higher baseline expression of COX-2 protein than normal keratinocytes, and that COX-2 expression in both cell lines decreased in a time-dependent manner with serum starvation. In both cell lines, stimulation with phorbol myristate acetate (PMA) or canine interferon- γ (INF- γ) induced a time-dependent increase in COX-2 protein, with COX-2 induction being stronger in SCC than in CK. Moreover, SCC were found to produce more PGE₂ than CK, under both baseline and stimulated conditions. Finally, PGE₂ synthesis of both CK and SCC could be completely abrogated with NS-398 or indomethacin while cell proliferation was not affected by these COX inhibitors. Collectively, our results indicate that canine neoplastic keratinocytes expressed more COX-2 and produced more PGE₂ than normal keratinocytes, thereby providing an *in vitro* system to study the molecular regulation of COX-2 in the oncogenesis of squamous cell carcinomas in dogs.

Keywords: Keratinocytes, Dog, Cyclo-oxygenase, Prostaglandins, Squamous cell carcinoma.

INTRODUCTION

Squamous cell carcinoma (SCC) is a commonly diagnosed cancer in dogs, with cutaneous SCCs accounting for 5.4 per cent of all cutaneous neoplasms and for 20 to 30% of oral tumors in dogs (Bostock 1986, Withrow 1996). SCCs are locally invasive tumors that can originate from various locations including the skin, digits, oral mucosa, tonsils, and nasal planum. Their metastatic potential appears to be influenced by their location, with tumors localized to digits or tonsils behaving in a more aggressive fashion than tumors from other areas (Marino et al. 1995; Moulton 1990). For example, most dogs with tonsillar SCC will succumb to metastatic disease within one year after the diagnosis is made (Todoroff and Brodey 1979). Therapeutic management of most SCCs consists of surgical resection and/or radiation therapy and is often successful, but effective treatment for nonresectable or SCCs that have already metastasized still needs to be developed.

Cyclo-oxygenase-2 (COX-2), also known as prostaglandin endoperoxide synthase-2, is an inducible form of the enzyme responsible for the biosynthesis of prostaglandins. COX-2 is normally absent in most tissues, but its expression can be induced by a variety of stimuli, and COX-2 is the isoform involved in pathological processes such as inflammation and oncogenesis (Turini and DuBois 2002). In particular, increasing evidence indicates that COX-2 is implicated in the oncogenesis of various epithelial cancers in humans, including SCCs (Chan et al. 1999; Kagoura et al. 2001; Lee et al. 2002; Renkonen et al. 2002). Such evidence includes several reports documenting the presence of increased amounts of COX-2 in SCCs, and the elevated production of prostaglandins, particularly PGE₂, by cancers compared to normal tissues (Pinto et al. 1990; Snyderman et al. 1995). Experimentally, selective inhibition of COX-2 has been reported to reduce the growth of xenografts of human SCCs of the head and neck in nude mice (Nishimura et al. 1999). Moreover, recent genetic studies of mice

overexpressing COX-2 in the skin have shown that COX-2 overexpression transforms the epidermis into an autopromoted skin phenotype whereas initiation with a subcarcinogenic dose of a carcinogen without the application of a promoter is sufficient to induce skin carcinogenesis (Müller-Decker et al. 2002). The implication of COX-2 to the initiation, promotion and/or progression of cancers in dogs is not yet understood. COX-2 overexpression has so far been documented in canine renal, urinary, prostatic, intestinal and mammary cancers as well as in SCCs (Khan et al. 2000, 2001; Tremblay et al. 1999; McEntee 2002; Pestili de Almeida et al. 2001; Lanthier et al. 2003). Indeed, we have recently studied the expression of COX-2 in forty cases of canine SCCs originating from various locations, and found that the neoplastic keratinocytes in all cases significantly overexpressed COX-2 (Pestili de Almeida et al. 2001). The molecular basis and cellular consequences of COX-2 induction in canine neoplastic keratinocytes are unknown. Therefore, the objective of the present study was to characterize an *in vitro* model of canine normal and neoplastic keratinocytes to investigate the expression, regulation and possible role of COX-2 overexpression in canine SCCs.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), dimethyl sulfoxide (DMSO), cholera toxin, phorbol myristate acetate (PMA) and indomethacin were obtained from Sigma Aldrich Canada (Oakville, Ont, Canada); Hybond polyvinylidene difluoride membranes 0.45 μ m (PVDF) were purchased from ICN Pharmaceuticals (Montreal, PQ, Canada); Kodak Bio-Max X-ray film was obtained from Eastman Kodak Company (Rochester, NY); ECL+ plus kit and enhanced chemiluminescence detection, Western blotting detection system were obtained from Amersham Pharmacia Biotech UK; Vectastain ABC kit was purchased from Vector Laboratories (Burlington, On, Ca); anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase linked whole antibody from donkey was obtained from Amersham Life Science; the cell proliferation reagent WST-1 was purchased from Roche Diagnostics; NS-398 was purchased from Cayman Chemical CO (Ann Arbor, MI); Dulbecco' Modified Eagles's Medium (DMEM), William's, HEPES tampon, Phosphate buffered saline (PBS), Hank's balanced Salt Solution (HBSS) and fetal bovine serum were purchased from Gibco BRL Life Technology, Inc. (Grand Island, NY), EGF was obtained from Pepro Tech Inc. (Rocky Hill, NJ), Bio-Rad Protein Assay and electrophoretic reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA); recombinant human tumor necrosis factor- α (rhuTNF- α), recombinant human transforming growth factor- α (rhuTGF- α), and recombinant canine interferon- γ (rcanINF- γ) were from R&D systems (Minneapolis, MN).

Cell Culture. The establishment of cultures of normal and neoplastic canine keratinocytes has previously been described (Suter et al. 1991; Wilkinson et al. 1987). The CK and SCC cell lines were established from normal oral canine keratinocytes and from a spontaneous oral canine SCC, respectively. Both cell lines were cultured in William's Medium E supplemented with cholera toxin (10^{-10} M), epidermal growth factor (10 ng/ml), 10% fetal calf

serum and penicillin G (100 U/ml)-streptomycin (100 μ g/ml). Cells were incubated at 37 °C in 5% CO₂, 95% air, and passaged by exposure to trypsin/EDTA (0.05/0,02% w/v) in Dulbecco's PBS.

Solubilized Cell Extracts and Immunoblot Analysis. Solubilized cell extracts were prepared as previously described (Sirois and Doré 1997). Briefly, cells were homogenized on ice in TED homogenization buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 mM DEDTC, pH 8.0) supplemented with 2 mM octyl glucoside, and centrifuged at 30,000 x g for 1 h at 4 °C. The crude pellets containing membranes, nuclei and mitochondria were sonicated (8 sec/cycle; 2 cycles) in TED sonication buffer (20 mM Tris, 50 mM EDTA, 0.1 mM DEDTC, pH 8.0) containing 32 mM octyl glucoside. The sonicates were centrifuged at 13,200 x g for 15 min at 4 °C. The supernatants (solubilized cell extracts) were stored at -70 °C until immunoblot analysis. The protein concentration in each extract was determined by the method of Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Proteins were resolved by one-dimensional sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and electrophoretically transferred to Hybond polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, previously immersed in 100% methanol, rinsed in distilled water and equilibrated in transfer buffer for 10 minutes before blotting. Blocking of membranes was done using 5% nonfat dry milk in 0.1% TTBS (0.1% Tween-20, 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.5) for 1h at room temperature, then washed twice for 2 min at room temperature with 0.1% TTBS. After blockage, membranes were incubated with a selective anti-COX-2 antibody (MF243 at 1:7,500 dilution) diluted in 0.05% TTBS (0.05% Tween-20, 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.5) containing 2% nonfat dry milk for 2 h at room temperature. Membranes were incubated with a horseradish-peroxidase-labeled donkey anti-rabbit secondary antibody (1:15,000 dilution) for 1h at room temperature. The membranes were washed and the bound secondary antibody was detected using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit. The signal was visualized on Kodak Bio-Max X-ray film.

Prostaglandin E₂ Radioimmunoassay. Concentrations of PGE₂ were measured directly in culture media, as previously described (Liu et al. 2001). The antiserum was purchased from Assay Designs Inc. (Ann Arbor, MI); its cross-reactivities against PGE₁, PGF_{1α}, PGF_{2α}, and 6-keto PGF_{1α} were 70%, 1.4%, 0.7% and 0.6%, respectively. The sensitivity of the assay was 40 pg/ml, and the intra- and interassay coefficients of variation were 6.3 % and 8.6%, respectively.

Immunocytochemistry. Cells were cultured in eight-chamber glass slides (Lab-Tek II) until they reached 70% confluency. Unstimulated cells were cultured in complete medium. For PMA stimulation, cells were cultured in medium without serum for 40 h before addition of PMA (5 ng/ml) for 24 h. After treatment, cells were fixed with 95% ethanol and 5% acetic acid, and immunocytochemical staining for COX-2 was performed using the Vectastain avidin:biotin complex (ABC kit), as previously described (Boutemmine et al. 2002).

Cell Proliferation Assay. Cell proliferation was measured using an assay based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt WST-1 to purple formazan crystals by metabolic active cells. For this assay, cells were seeded in 96-well plates at a density of 2,500 cells/well. After 24 h of culture in complete medium, a COX inhibitor (NS-398 or indomethacin) was added to the cells. NS-398 and indomethacin were dissolved in DMSO and absolute ethanol, respectively. Control wells received DMSO or ethanol at the highest concentration used with the inhibitors. After 24 h of culture with the inhibitor, WST-1 reagent was added to each well and the plate was incubated for 30 minutes at 37 °C. Spectrophotometric absorbance of the samples was measured with a microtiter plate reader at a wavelength at 450 nm.

RESULTS

Characterization of COX-2 expression and PGE₂ synthesis in normal and neoplastic canine keratinocytes.

Basal expression of COX-2 in both cell lines cultured in complete medium was determined by immunoblot analysis using a selective anti-COX-2 antibody, and results showed that the neoplastic cell line SCC expresses more COX-2 protein when compared to the normal cell line CK (Figure 1A). CK cells appeared as slightly larger than SCC cells (Figure 2A and 2C), and localization of the COX-2 protein by immunocytochemistry revealed a faint COX-2 expression in rare CK cells (Figure 2A) and a weak to moderate COX-2 expression in some SCC cells (Figure 2C). In agreement with COX-2 protein expression, levels of PGE₂ synthesized by SCC cells were higher than PGE₂ levels secreted by CK cells (Figure 1B). Serum starvation resulted in a time-dependent reduction of COX-2 expression and PGE₂ synthesis in both cell lines (Figure 1A and 1B). However, although COX-2 transcripts in CK cells had dropped to very low to undetectable levels after 24 h of serum starvation, detectable levels of COX-2 transcripts were still present in SCC cells, even after 72 h of serum deprivation (Figure 1A). Similarly, PGE₂ synthesis by both CK and SCC cells was diminished following serum starvation (Figure 1B).

Effect of PMA, INF- γ , TNF- α and TGF- α on COX-2 expression and PGE₂ synthesis in canine normal and neoplastic keratinocytes.

For experiments looking at the effect of stimulation on COX-2 expression, SCC and CK cells were serum-starved for 40 h before stimulation to decrease their basal levels of COX-2 expression. Stimulation with PMA (5 ng/ml) resulted in a time-dependent induction of COX-2 in both cell lines (Figure 3A). Induction of COX-2 by PMA was first observed at 6 h in CK cells and at 3 h in SCC cells, and became maximal at 6 and 12 h for CK and SCC

cells, respectively (Figure 3A). Interestingly, and as observed previously for basal COX-2 expression, the induction of COX-2 by PMA was stronger in SCC cells compared to CK cells (Figure 3A). This induction of COX-2 was accompanied by a corresponding increase in the synthesis of PGE₂ which was higher in SCC cells compared to CK cells at 3, 6 and 12 h (Figure 3B). PGE₂ levels in SCC had considerably diminished after 24 h. Immunocytochemical localization of COX-2 revealed a diffuse cytoplasmic COX-2 staining in CK cells and a more granular COX-2 staining in SCC cells (Figure 2B and 2D). PMA stimulation induced a change in phenotype in SCC cells, with the cells assuming a plumper conformation (Figure 2D).

Stimulation of normal and neoplastic keratinocytes with rcalNF- γ resulted also in the induction of COX-2 protein, with a stronger COX-2 induction observed in SCC compared to CK cells (Figure 4A). The induction occurred earlier in SCC cells than in CK (6 h vs 12 h), and was sustained until 48 h (Figure 4A). PGE₂ production was increased after 48 h of incubation with rcalNF- γ , with SCC cells producing more PGE₂ than CK at 48 h (Figure 4B). In contrast, stimulation with rhuTNF- α (50 ng/ml) resulted in an induction of COX-2 in CK cells only at 24 hours while only a weak increase in COX-2 protein was observed between 6 and 24 h in TNF- α -treated SCC cells (Figure 5A). Moreover, rhuTNF- α did not induce a significant production of PGE₂ in either cell line (Figure 5B). Finally, incubation of the keratinocytes with rhuTGF- α had no effect on either COX-2 protein levels or PGE₂ synthesis (data not shown).

Effect of COX-2 inhibition on PGE₂ synthesis and cell proliferation by normal and neoplastic canine keratinocytes.

NS-398 is a selective COX-2 inhibitor (Futaki et al. 1994), and its effect on PGE₂ synthesis and cell proliferation of canine keratinocytes was evaluated. NS-398 caused a dose-dependent and dramatic inhibition of PGE₂ synthesis in both CK and SCC cells (Figure 6A). The inhibition was

observed at a concentration as low as 1 μ M NS-398. In contrast, the same concentrations of NS-398 had very little effect on cell proliferation of both CK and SCC cells (Figure 7A). Indomethacin which inhibits both COX-1 and COX-2 (Meade et al. 1993), also decreased in a concentration-dependent manner PGE₂ synthesis (Figure 6B), but had very little effect on cell proliferation in both cell lines (Figure 7B).

DISCUSSION

This is the first study comparing the expression and regulation of the enzyme COX-2, and the synthesis of PGE₂ between normal and cancerous canine cultured keratinocytes. Our results indicate that the cancerous canine keratinocyte cell line expresses more COX-2 protein and produces more PGE₂ than the normal canine keratinocyte cell line. COX-2 expression was reduced following serum starvation, but COX-2 levels remained detectable even after 72 hours in neoplastic keratinocytes while they were low or undetectable after 24 hours of serum starvation in normal keratinocytes. These results are in agreement with our recent observation that COX-2 is overexpressed in canine squamous cell carcinomas while normal canine skin displays no or faint COX-2 (Pestili de Almeida et al. 2001). Elevated COX-2 expression has also been reported in skin carcinomas in humans (Chan et al. 1999; Kagoura et al. 2001; Lee et al. 2002), and a recent report documented that both COX-2 expression and PGE₂ production were significantly enhanced in two human epidermal cancer cell lines compared to a non-tumoral human keratinocyte cell line (Higashi et al. 2000). Therefore, in both human and canine, the *in vitro* systems mimic the *in vivo* situation, and will allow the study of the molecular mechanisms regulating COX-2 expression in keratinocytes.

Stimulation of the keratinocytes with PMA, a direct activator of protein kinase C, and with INF- γ resulted in a several-fold increase in COX-2 protein and PGE₂ synthesis in both normal and neoplastic keratinocytes. As observed with unstimulated keratinocytes, COX-2 expression and PGE₂ synthesis were both stronger in neoplastic keratinocytes compared to normal keratinocytes after PMA and INF- γ stimulation, suggesting the existence of differences in the regulation of COX-2 between normal and neoplastic canine keratinocytes. Differences in the transcriptional regulation of COX-2 have been identified in mouse skin carcinoma cells (Kim and Fischer 1998). In these cells, E-box, nuclear factor for IL6 expression (NF-IL6), upstream

stimulatory factor and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) were reported to be cis- and trans-acting factors involved in COX-2 expression. Interestingly, it was found that C/EBP α and β were the major isoforms in normal skin, while C/EBP β and δ were the predominant proteins at the NF-IL6 site in carcinoma cells, suggesting that differential expression of C/EBP isoforms may contribute to the constitutive overexpression of COX-2 in neoplastic tissues. Further studies are needed to determine the signaling pathway leading to COX-2 overexpression in canine neoplastic keratinocytes.

Our results with INF- γ contrast with a recent study showing that INF- γ induced COX-2 mRNA and protein in normal human epidermal keratinocytes but not in two human squamous cell carcinoma cell lines (SCC13 and SQCC/Y1) (Matsuura et al. 1999). In human keratinocytes, enhanced expression of TGF- α appears to play an important role in the induction of COX-2 by INF- γ , and the authors speculated that the refractoriness of some cell lines could mean that the cells could harbor defects in the INF- γ or TGF- α signaling pathways (Matsuura et al. 1999). The present results indicate that our canine keratinocytes do not harbor such defects since they both responded well to INF- γ . However, it is possible that the canine keratinocytes did not respond to TGF- α because it was of human origin since recombinant human INF- γ had no effect on canine keratinocytes (data not shown).

In comparison with PMA and INF- γ , TNF- α only weakly induced COX-2 and PGE₂ production in normal and neoplastic canine keratinocytes. TNF- α has previously been shown to induce COX-2 expression in different types of cancerous cells such as pulmonary, colorectal and prostatic cells, including in a prostatic adenocarcinoma cell line of canine origin (Yoshimatsu 2001a, 2001b; Subbarayan et al. 2001; Boutemmine et al. 2002). The weak COX-2 induction observed with canine keratinocytes suggests the existence of differences in the TNF- α -induced COX-2 expression in cancerous cells originating from different tissues.

The increased synthesis of PGE₂ by neoplastic keratinocytes could contribute to the oncogenesis of squamous cell carcinomas in dogs. PGE₂ is one of the most common prostanoid with potent biological activities, and acts to promote tumor growth through its mitogenic activity, its proangiogenic activity and inhibition of apoptosis (Koki et al. 2002). It has been shown that the growth of primary adult human keratinocytes is stimulated by activation of EP2, one of the PGE₂ receptors, and subsequent production of cAMP (Konger et al. 1998). A recent study has revealed that the loss of this receptor in human keratinocytes results in a more aggressive phenotype with increased invasiveness and decreased expression of paxillin, a component of focal adhesion assembly (Konger et al. 2002). These results suggest that increased PGE₂ production in advanced malignancies could lead to a more aggressive tumor as a result of ligand-dependent receptor downregulation.

Inhibition of COX-2, either with the selective COX-2 inhibitor NS-398 or with indomethacin, which inhibits both COX-1 and COX-2, resulted in a drastic reduction of PGE₂ synthesis in both normal and cancerous keratinocytes, even at concentration of the inhibitors as low as 1 μ M. However, the same inhibitors had very little effect on the proliferation of these cell lines, with a slight reduction in cell proliferation observed only at the highest concentrations (100 and 200 μ M). These results are in agreement with a recently published study on human oral SCC lines where the authors found that low concentrations (10 μ M) of NS-398 were sufficient to abolish PGE₂ production while higher concentrations of the inhibitor were required to induce a significant growth inhibition of the cancer cells (Minter et al. 2003). Similarly, Kundu et al. (2001) reported that the growth inhibition of a murine mammary tumor cell line was observed only at concentrations of NS-398 or indomethacin greater than those required to ablate PGE₂ synthesis. Altogether, these studies suggest that the inhibitory effect of NS-398 or indomethacin on cell proliferation is mediated through mechanisms that are dependent and independent of suppression of PGE₂ synthesis.

Increasing epidemiological and pharmacological evidence indicates that COX-2 is a potential therapeutic target for the prevention and treatment of cancer (Subbaramaiah and Dannenberg 2003). For example, selective inhibition of COX-2 using celecoxib resulted in a significant reduction of ultraviolet light-induced skin tumors in mice (Pentland et al. 1999; Fischer et al. 1999). Interestingly, piroxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug that blocks PG synthesis, has been reported to have antitumor effect in dogs with squamous cell carcinomas (Knapp et al. 1992; Schmidt et al. 2001). Indeed, Schmidt et al. (2001) recently reported a study of 17 dogs with oral squamous cell carcinomas that were treated daily with piroxicam and reported a remission in three dogs (18%) and a stable disease in five animals (29%), suggesting that piroxicam alone or in combination with other chemopreventive agent could be used in the future for the treatment of dogs with squamous cell carcinomas. Results of the present study indicate that our normal and neoplastic cultured canine keratinocytes represent an appropriate model to investigate the molecular basis of COX-2 induction in squamous cell carcinomas in dogs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Stacia Kargman, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Pointe-Claire-Dorval, Québec for kindly providing antibody MF243 and Ms. Danielle Rannou for technical assistance. This work was supported by grants from the Morris Animal Foundation (M.D. and J.S.), the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (M.D.), and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) (J.S.). J.S. is the recipient of a CIHR Investigator Award.

REFERENCES

Bostock DE 1986 Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *British Vet J* 142:1-9.

Boutemmine D, Bouchard N, Boerboom D, Jones HE, Goff AK, Doré M, Sirois J 2002 Molecular characterization of canine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation in prostatic adenocarcinoma cells *in vitro*. *Endocrinology* 143:1134-1143.

Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ 1999 Cyclo-oxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 59:991-994.

Fischer SM, Lo HH, Gordon GB, Seibert K, Kelloff G, Lubet RA, Conti CJ 1999 Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclo-oxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 25:231-240.

Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S 1994 NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclo-oxygenase (COX-2) activity *in vitro*. *Prostaglandins* 47:55-59.

Head KW Tumors of the alimentary tract. In: Moulton JE ed. *Tumors in domestic animals* 3rd ed. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, 1990;351-353.

Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T 2000 Enhanced expression of cyclo-oxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer* 86:667-671.

Kagoura M, Toyoda M, Matsui C, Morohashi M 2001 Immunohistochemical expression of cyclo-oxygenase-2 in skin cancers. *J Cutan Pathol* 28:298-302.

Khan KN, Knapp DW, Denicola DB, Harris RK 2000 Expression of cyclo-oxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am J Vet Res* 61:478-481.

Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D, Knapp DW 2001 Expression of cyclo-oxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol* 38:116-119.

Kim Y, Fischer SM 1998 Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase-2 in mouse skin carcinoma cells. Regulatory role of CCAAT/enhancer-binding proteins in the differential expression of cyclo-oxygenase-2 in normal and neoplastic tissues. *J Biol Chem* 273:27686-27694.

Knapp DW, Richardson RC, Bottoms GD, Teclaw R, Chan TC 1992 Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 29:214-218.

Koki AT, Khan NK, Woerner BM, Seibert K, Harmon JL, Dannenberg AJ, Soslow RA, Masferrer JL 2002 Characterization of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) during tumorigenesis in human epithelial cancers: evidence for potential clinical utility of COX-2 inhibitors in epithelial cancers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:13-18.

Konger RL, Malaviya R, Pentland AP 1998 Growth regulation of primary human keratinocytes by prostaglandin E receptor EP2 and EP3 subtypes. *Biochim Biophys Acta* 1401:221-234.

Konger RL, Scott GA, Landt Y, Ladenson JH, Pentland AP 2002 Loss of the EP2 prostaglandin E₂ receptor in immortalized human keratinocytes results in increased invasiveness and decreased paxillin expression. *Am J Pathol* 161:2065-2078.

Kundu N, Yang Q, Dorsey R, Fulton AM 2001 Increased cyclo-oxygenase-2 (COX-2) expression and activity in a murine model of metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 94:681-686.

Lanthier I, Sirois J, Doré M 2003 Cyclo-oxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 40:207-212.

Lee DW, Sung MW, Park SW, Seong WJ, Roh JL, Park B, Heo DS, Kim KH 2002 Increased cyclo-oxygenase-2 expression in human squamous cell carcinomas of the head and neck and inhibition of proliferation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Anticancer Res* 22:2089-2096.

Liu J, Antaya N, Goff AK, Boerboom D, Silversides DW, Lussier JG, Sirois J 2001 Molecular characterization of bovine prostaglandin g/H synthase-2 and regulation in uterine stromal cells. *Biol Reprod* 64:983-991.

Marino DJ, Matthiesen DT, Stefanacci JD, Moroff SD 1995 Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981-1991). *J Am Vet Med Assoc* 207:726-7728.

Matsuura H, Sakaue M, Subbaramaiah K, Kamitani H, Eling TE, Dannenberg AJ, Tanabe T, Inoue H, Arata J, Jetten AM 1999 Regulation of cyclo-oxygenase-2 by interferon gamma and transforming growth factor- α in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 41:29138-29148.

McEntee MF, Cates JM, Neilsen N 2002 Cyclo-oxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Vet Pathol* 39:428-436.

Meade EA, WL Smith, DeWitt DL 1993 Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (Cyclo-oxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 268:6610-6614.

Minter HA, Eveson JW, Huntley S, Elder JE, Hague A 2003 The cyclo-oxygenase-2 selective inhibitor NS-398 inhibits proliferation of oral carcinoma cell lines by mechanisms dependent and independent of reduced prostaglandin E₂ synthesis. *Clin Cancer Res* 9:1885-1897.

Nishimura G, Yanoma S, Mizuno H, Kawakami K, Tsukuda M 1999 A selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor suppresses tumor growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 90:1152-1162.

Pentland AP, Schoggins JW, Scott GA, Khan KNM, Han R 1999 Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis* 20:1939-1944.

Pestili de Almeida EM, Piché C, Sirois J, Doré M 2001 Expression of cyclo-oxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem* 49:867-875.

Pinto S, Gallo O, Dilaghi M, Gallina E, Giannini A, Coppo M, Paniccia R, Prisco D, Abbate R 1990 Prostaglandins in squamous cell carcinoma of the larynx: tumor and peritumor synthesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 39:53-57.

Renkonen J, Wolff H, Paavonen T 2002 Expression of cyclo-oxygenase-2 in human tongue carcinoma and its precursor lesions. *Virchows Arch* 440:594-597.

Schmidt BR, Glickman NW, DeNicola DB, de Gortari AE, Knapp DW 2001 Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 218:1783-1786.

Sirois J, Doré M 1997 The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. *Endocrinology* 138:4427-4434.

Snyderman CH, Milanovich M, Wagner RL, Johnson JT 1995 Prognostic significance of prostaglandin E₂ production in fresh tissues of head and neck cancer patients. *Head Neck* 17:108-113.

Subbaramaiah K, Dannenberg AJ 2003 Cyclo-oxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends in Pharmacol Sci* 24:96-102.

Subbarayan V, Sabichi AL, Llansa N, Lippman SM, Menter DG 2001 Differential expression of cyclo-oxygenase-2 and its regulation by tumor necrosis factor- α in normal and malignant prostate cells. *Cancer Res* 61:2720-2726.

Suter MM, Pantano DM, Flanders JA, Augustin-Voss HG, Dougherty EP, Varvayanis M 1991 Comparison of growth and

differentiation of normal and neoplastic keratinocyte cultures. *Vet Pathol* 28:131-138.

Todoroff RJ, Brodey RS 1979 Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *J Am Vet Med Assoc* 175:567-571.

Tremblay C, Doré M, Bochsler PN, Sirois J 1999 Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 9:1398-1403.

Turini ME, DuBois RN 2002 Cyclo-oxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med* 53:35-57.

Wilkinson JE, Smith CA, Suter MM, Lewis RM 1987 Long term cultivation of canine keratinocytes. *J Invest Dermatol* 88:202-206.

Withrow SJ Tumours of the gastrointestinal system. Cancer of the oral cavity. In: Withrow SJ, MacEwen EG, eds. *Small animal clinical oncology*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1996;227-235.

Yoshimatsu K, Golijanin D, Paty PB, Soslow RA, Jakobsson PJ, DeLellis RA, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ 2001 Inducible microsomal prostaglandin E synthase is overexpressed in colorectal adenomas and cancer. *Clin Cancer Res* 7:3971-3976.

Yoshimatsu K, Altorki NK, Golijanin D, Zhang F, Jakobsson PJ, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K 2001 Inducible prostaglandin E synthase is overexpressed in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 7:2669-2674.

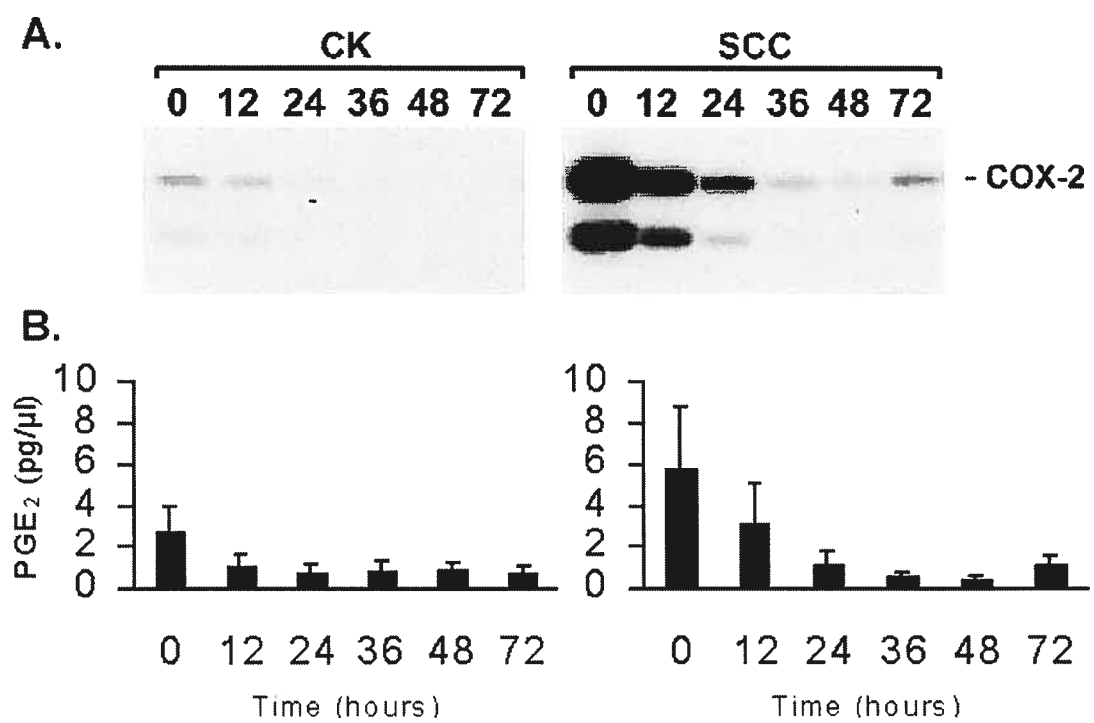


Figure 1

Figure 1. Effect of serum deprivation on COX-2 protein and PGE₂ synthesis in normal and neoplastic canine keratinocytes. Normal (CK) and neoplastic (SCC) canine keratinocytes were cultured in complete medium (time 0) or in serum-deprived medium for 12, 24, 36, 48 or 72 h, as described in Materials and Methods. (A) Cell extracts were prepared from cultures, and proteins (50 μ g/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE, and immunoblotting techniques using a COX-2 selective antibody. Results from a representative experiment are shown. Similar results were obtained for two other independent experiments. Markers on the right indicate migration of intact COX-2 protein ($M_r = 72,000$). (B) Concentrations of PGE₂ in culture medium were determined. Results are presented as picograms of PGE₂ per microliter of media (mean \pm SEM from four independent experiments).

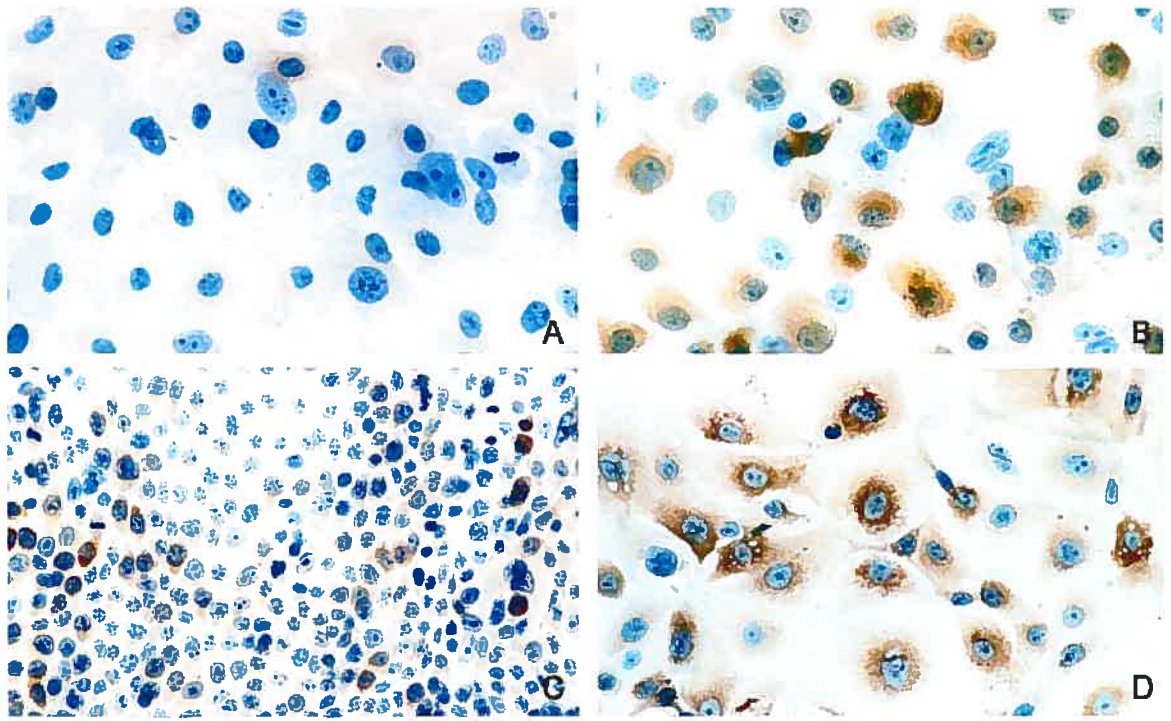


Figure 2

Figure 2. Immunocytochemical detection of COX-2 in normal and neoplastic canine keratinocytes. Immunocytochemistry was performed on normal (CK) or neoplastic (SCC) canine keratinocytes cultured for 24 h in the absence (A and C) or presence of PMA (5 ng/ml, B and D), as described in Materials and Methods. Immunostaining with a COX-2 selective antibody (MF243) revealed that COX-2 immunoreactivity was present in control cells (A and C), and was increased after PMA stimulation (B and D). Control staining with rabbit serum or PBS was negative (data not shown). Results are representative of three independent experiments.

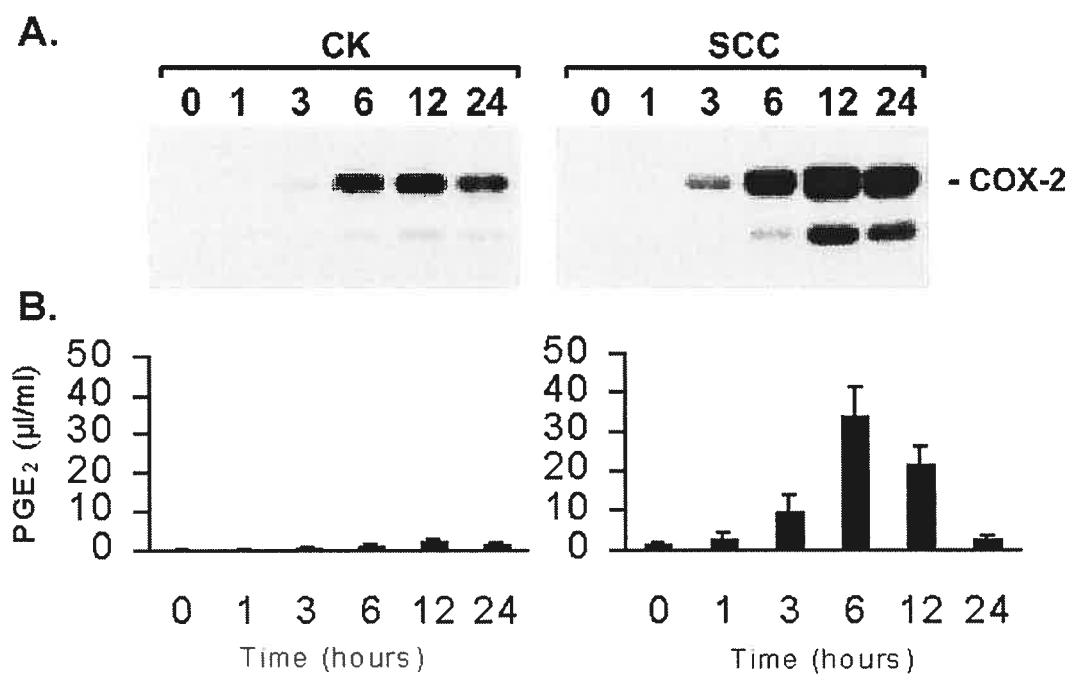


Figure 3

Figure 3. Time-dependent induction of COX-2 protein and PGE₂ synthesis by PMA in normal and neoplastic canine keratinocytes. Normal (CK) and neoplastic (SCC) canine keratinocytes were serum starved for 40 h, then cultured in the absence (time 0) or presence of PMA (5 ng/ml) for 1, 3, 6, 12 or 24 h, as described in Materials and Methods. (A) Cell extracts were prepared from cultures, and proteins (25 μ g/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE, and immunoblotting techniques using a COX-2 selective antibody. Results from a representative experiment are shown. Similar results were obtained for two other independent experiments. Markers on the right indicate migration of intact COX-2 protein ($M_r = 72,000$). (B) Concentrations of PGE₂ in culture medium were determined. Results are presented as picograms of PGE₂ per microliter of media (mean \pm SEM from nine independent experiments).

Figure 4. Time-dependent induction of COX-2 protein and PGE₂ synthesis by rcaINF- γ in normal and neoplastic canine keratinocytes. Normal (CK) and neoplastic (SCC) canine keratinocytes were serum starved for 40 h, then cultured in the absence (time 0) or presence of rcaINF- γ (200 U/ml) for 1, 3, 6, 12, 24 or 48 h, as described in Materials and Methods. (A) Cell extracts were prepared from cultures, and proteins (25 μ g/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE, and immunoblotting techniques using a COX-2 selective antibody. Results from a representative experiment are shown. Similar results were obtained for another independent experiment. Markers on the right indicate migration of intact COX-2 protein ($M_r = 72,000$). (B) Concentrations of PGE₂ in culture medium were determined. Results are presented as picograms of PGE₂ per microliter of media (from one experiment).

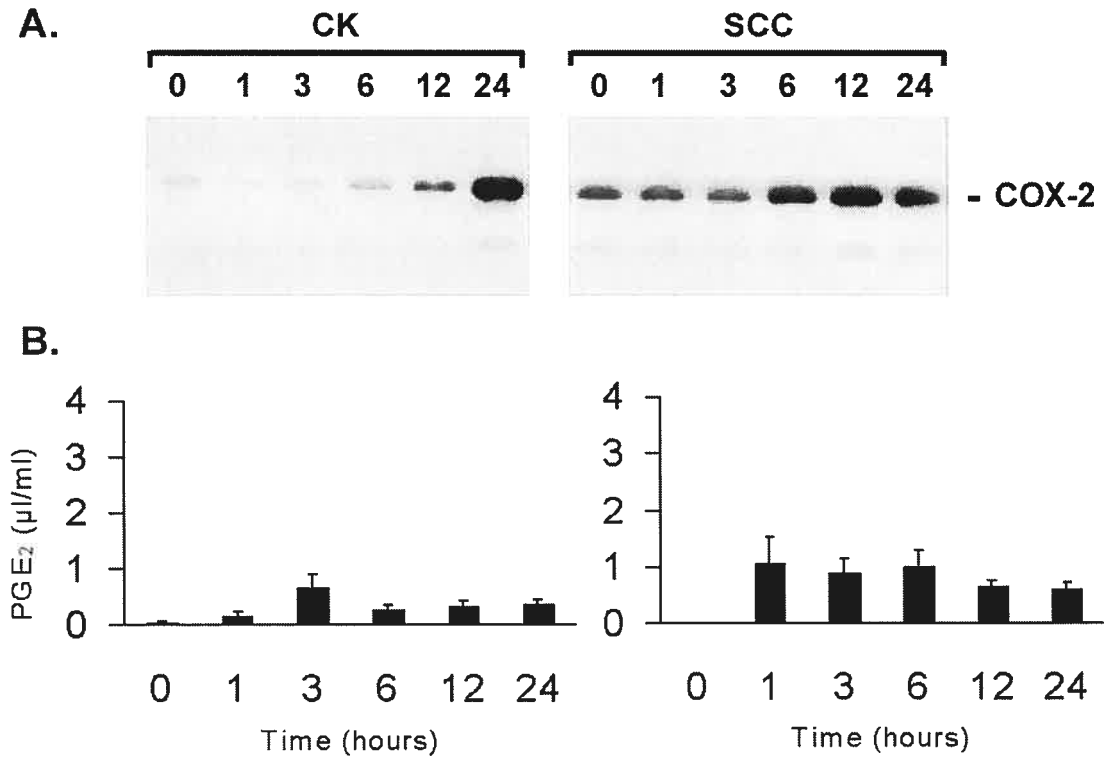


Figure 5

Figure 5. Time-dependent induction of COX-2 protein and PGE₂ synthesis by TNF- α in normal and neoplastic canine keratinocytes. Normal (CK) and neoplastic (SCC) canine keratinocytes were serum starved for 40 h, then cultured in the absence (time 0) or presence of TNF- α (50 ng/ml) for 1, 3, 6, 12 or 24 h, as described in Materials and Methods. (A) Cell extracts were prepared from cultures, and proteins (25 μ g/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE, and immunoblotting techniques using a COX-2 selective antibody. Results from a representative experiment are shown. Similar results were obtained for two other independent experiments. Markers on the right indicate migration of intact COX-2 protein ($M_r = 72,000$). (B) Concentrations of PGE₂ in culture medium were determined. Results are presented as picogram of PGE₂ per microliter of media (mean \pm SEM from seven independent experiments).

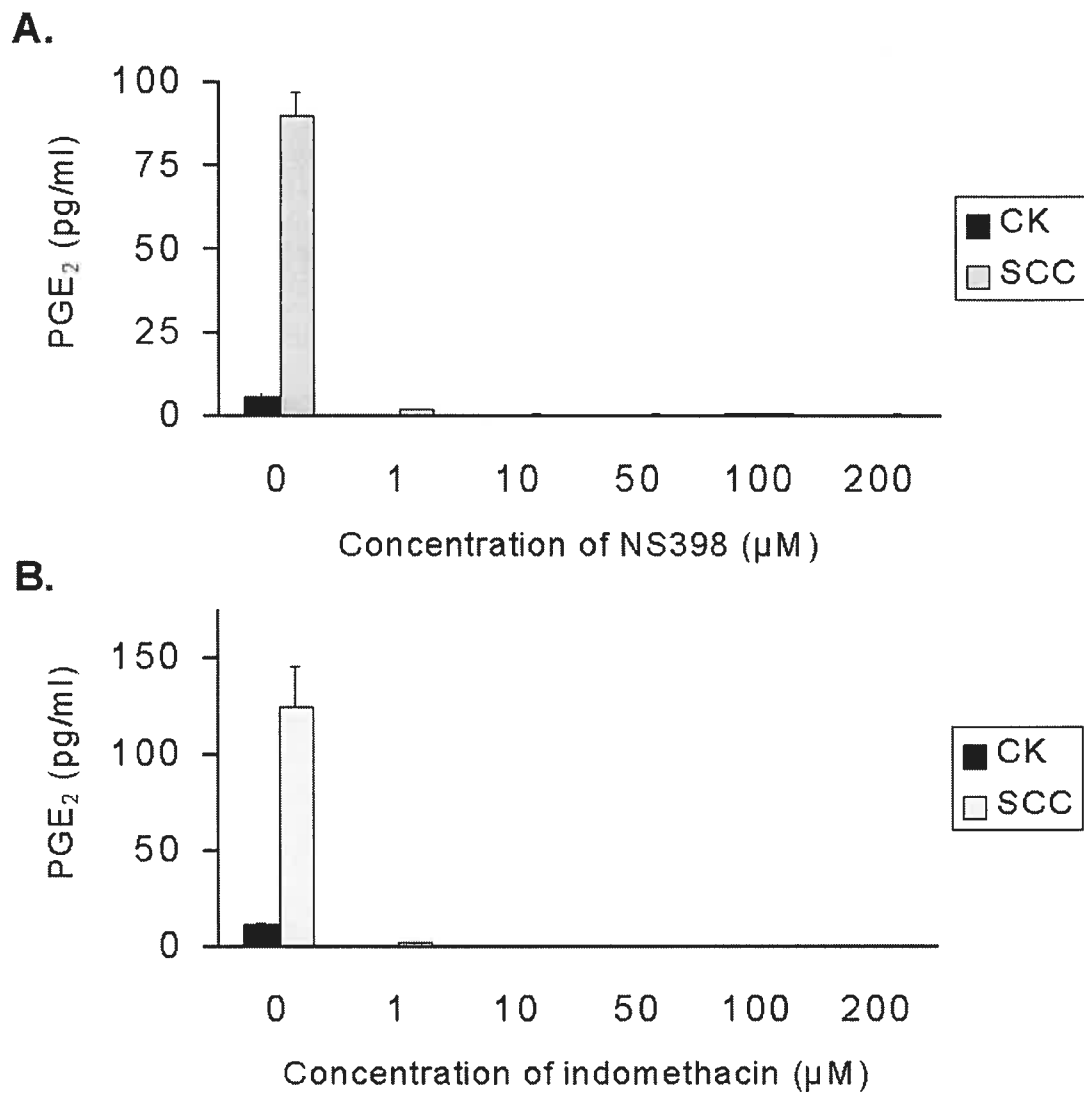
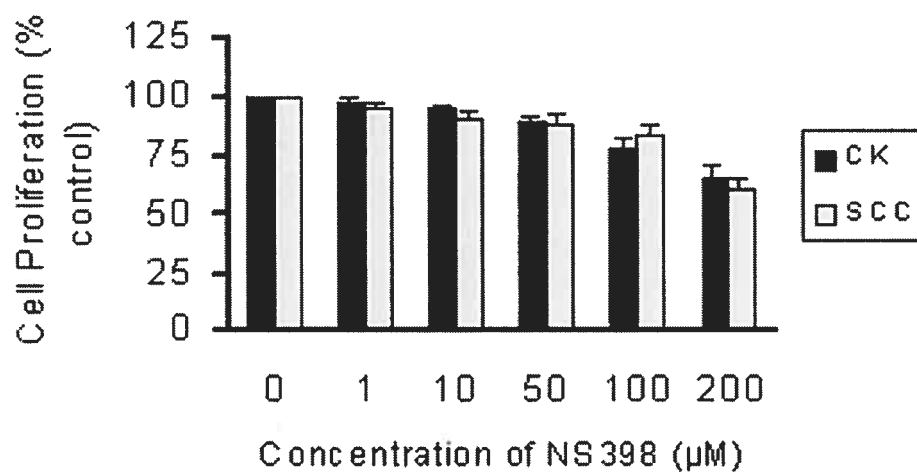


Figure 6

Figure 6. Effect of COX inhibition on PGE₂ synthesis by canine normal and neoplastic keratinocytes. Normal (CK) and neoplastic (SCC) canine keratinocytes were cultured in the absence (0) or presence of 1, 10, 50, 100 or 200 μ g/ml NS-398 (A) or indomethacin (B) for 24 h, as described in Materials and Methods. Concentrations of PGE₂ in culture medium were determined. Results are presented as picogram of PGE₂ per microliter of media (mean \pm SEM from seven [A] or six [B] independent experiments).

A.



B.

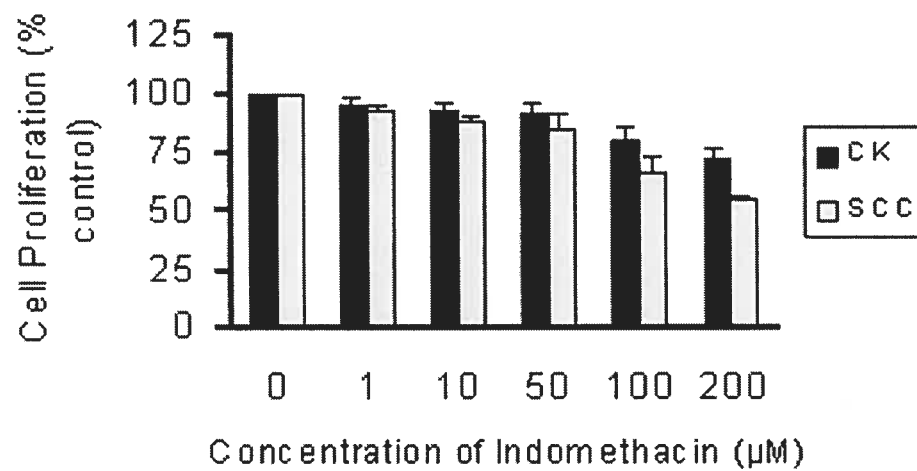


Figure 7

Figure 7. Effect of COX inhibition on cell proliferation of normal and neoplastic canine keratinocytes. Normal (CK) and neoplastic (SCC) canine keratinocytes were cultured in the absence (0) or presence of 1, 10, 50, 100 or 200 $\mu\text{g/ml}$ NS-398 (A) or indomethacin (B) for 24 h, as described in Materials and Methods. At the end of the culture period, WST-1 reagent was added to each well and the plate was incubated for 30 minutes at 37 °C. Spectrophotometric absorbance of the samples was measured with a microtiter plate reader at a wavelength at 450 nm. Cell proliferation is expressed as a percentage compared to control cultures without inhibitor (mean \pm SEM from eight [A] or six [B] independent experiments).

Discussion

L'expression de la COX-2 dans les tumeurs canines a été démontrée dans plusieurs études, comme celles portant sur les carcinomes de la peau (Pestili de Almeida et al., 2001), de la prostate (Tremblay et al., 1999), de la glande mammaire (Doré et al., 2003), du rein (Khan et al., 2001) et de l'intestin (McEntee et al., 2002). La présente étude a caractérisé la régulation de la COX-2 dans les kératinocytes canins normaux et néoplasiques, et ce, suite à l'étude démontrant que la COX-2 était fortement exprimée dans les kératinocytes des carcinomes spinocellulaires canins comparés à la peau normale du chien (Pestili de Almeida et al., 2001).

Dans les kératinocytes néoplasiques canins, le niveau de la protéine COX-2 est fortement exprimée par rapport à celui des kératinocytes normaux, où elle est presque absente. Une analyse d'immunobuvardage et d'immunocytochimie a permis de parvenir à ces résultats. An et al. (2002) ont également démontré cette augmentation du niveau de la protéine dans le CSC chez les souris et les humains. Leurs analyses d'immunobuvardage ont confirmé l'absence d'expression de la protéine de la COX-2 dans la peau normale, tandis que la peau exposée aux UV et ayant développé un carcinome a une expression accrue de la COX-2 et de sa protéine. D'autres études rapportent aussi des évidences reliant la surexpression de la COX-2 et le CSC (Shamma et al., 2000 ; Gallo et al., 2001 ; Ranelletti et al., 2001). Cette augmentation de la quantité de protéine et de la surexpression de la COX-2 est due au fort taux de la transcription du gène COX-2 (DeWitt et Meade, 1993) et elle est accompagnée d'une augmentation de la capacité des tissus à synthétiser des PGs (DeWitt, 1991). Cependant, le rôle précis que peuvent jouer l'expression de la COX-2 et les hauts niveaux de PGs dans le processus de la promotion de la tumeur demeure encore incompris. De nombreuses observations soutiennent que les PGs ont un rôle important dans le développement des tumeurs de la peau. Il a été bien établi que les promoteurs de tumeur induisent l'expression de la COX-2 et que les tumeurs

résultantes expriment de manière constitutive la COX-2, ce qui est en corrélation avec la synthèse élevée de PG (Müller-Decker et al., 1995). La prédominance de la PGE₂ comme métabolite majeur a été démontrée dans le CSC de la tête et du cou (Karmali et al., 1984), dans deux lignées de carcinomes pulmonaires (Lau et al., 1987) et dans le carcinome pulmonaire de Lewis (Chiabrando et al., 1985).

De plus, les produits de la COX sont plus importants et davantage en corrélation avec des croissances tumorales que les produits de la lipoxigénase (Vanderveen et al., 1986). Il semblerait que la surexpression de la COX-2 est associée à une réduction de la synthèse des produits de la lipoxigénase. Des lipoxigénases sont exprimées dans l'épiderme murin et cette famille d'enzymes, qui synthétise les acides hydroxyéicosatétraénoïques (HETEs), concurrence la COX-1 et la COX-2 pour l'AA, le précurseur des PGs et des HETEs. Les niveaux élevés de la COX-2 peuvent mener à la production de PGs, aux dépens des HETEs qui sont également souvent impliqués dans le développement de plusieurs tumeurs (Liu et al., 1991 ; Tang et al., 1995).

Notre étude démontre que la biosynthèse de PGE₂ par les kératinocytes surexprimant la COX-2, soit les kératinocytes néoplasiques, est amplement supérieure à celle de la lignée normale. Une réduction de l'expression de la COX-2 et de la synthèse de PGE₂ a cependant été observée suite à la culture de cellules dans un milieu sans sérum. Cette diminution a été observée dans les deux lignées cellulaires, les normales et les néoplasiques. Erickson et al. (1999) ont obtenu des résultats semblables avec des lignées de cellules intestinales cancéreuses de rat et de cellules du cancer du côlon de souris. Ils ont démontré que l'expression de la COX-1 diminuait dans les cellules incubées dans un milieu sans sérum et que cette expression était accrue lors d'une incubation dans un milieu supplémenté avec 10% de sérum. L'expression de la COX-2 n'a cependant pas été démontrée dans les milieux sans sérum, mais elle était présente dans les cellules maintenues dans des milieux comprenant 10% de sérum. La

synthèse spontanée d'ADN était présente dans ces lignées cellulaires et le sérum a permis de stimuler leur prolifération (Erickson et al., 1999). Le sérum utilisé contient des composants non-définis qui peuvent interférer dans plusieurs études *in vitro* (Cramer et al., 1997).

L'effet contraire a été obtenu en ajoutant au milieu un agent régulateur de la COX-2, tel le PMA. Il existe corrélation entre la PGE₂, l'irritation cutanée et la promotion de la tumeur, ces dernières induites par des phorbol esters, mais le mécanisme d'action n'est pas entièrement compris et le rôle de la PGE₂ provenant des kératinocytes est peu clair. On a récemment rapporté que la PGE₂ module la différenciation des kératinocytes, alors que le PMA stimule la relâche de PGE₂ dans les kératinocytes humains (Lawrence et Benford, 1995). De plus, selon Subbaramaiah et al. (1998), le traitement des cellules épithéliales mammaires avec du PMA induit l'expression de la COX-2 et cause une augmentation marquée de la production de la PGE₂. En effet, un fort taux de transcription de la COX-2 est obtenu après un traitement avec du PMA et l'activité de la COX-2 est augmentée six fois. D'autres études se sont intéressées au PMA et les chercheurs ont pu démontrer que cet agent permettait l'induction de la différenciation terminale dans la majorité des kératinocytes humains et murins en culture (Parkinson et al., 1984) et l'induction de l'expression de la COX-2 (Scholz et al., 1995). Ces recherches supportent nos résultats qui indiquent que l'induction de l'expression de la COX-2 par le PMA était sensiblement plus forte dans les kératinocytes néoplasiques que dans les cellules normales. La biosynthèse de PGE₂ était également augmentée dans les cellules néoplasiques par rapport aux cellules normales.

Comme les résultats le démontrent, l'expression de la COX-2 et la synthèse de la PGE₂ sont également influencées par d'autres agents régulateurs. Par exemple, le TNF- α agit comme un promoteur endogène tumoral, en activant la transcription du NF- κ B dans les cellules cancéreuses et limitant ainsi l'apoptose (Basu et al., 1998 ; Ueda et al., 2003). L'IFN- γ joue aussi un rôle de promoteur de tumeur. Il affecte la croissance et la

différenciation de kératinocytes épidermaux en culture (Nickoloff, 1991 ; Saunders et Jetten, 1994 ; Nickoloff et al., 1989) et induit l'expression de la COX-2 tout en augmentant la production de PGE₂ dans les kératinocytes humains normaux (Matsuura et al., 1999). Ces chercheurs ont par ailleurs démontré que l'augmentation de la protéine COX-2 par l'IFN-γ serait la cause de l'augmentation de la synthèse des PGs par les kératinocytes normaux, ce qui supporte la présente étude.

Les mécanismes par lesquels l'expression de la COX-2 contribue à la carcinogénèse comprennent principalement la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et celle de la réponse immunitaire (Fischer, 1997). Une étude a démontré que l'augmentation de l'expression de la COX-2 dans des cellules cutanées cancéreuses humaines jouait un rôle important dans la croissance cellulaire, davantage que dans les cellules normales (Higashi et al., 2000). La COX est une enzyme possédant une activité cyclo-oxygénase, qui convertit l'AA en PGG₂, et une activité peroxidase, qui génère la PGH₂, le précurseur de la PGE₂, à partir du PGG₂. En plus de son rôle dans la synthèse des PGs, l'activité peroxidase de la COX contribue à la production de superoxide et cause des altérations dans l'équilibre d'oxydo-réduction intracellulaire, ce qui est associé aux perturbations de la croissance cellulaire (Chinery et al., 1998).

La production de PGE₂ par nos lignées cellulaires a pu être supprimée par le NS-398, un inhibiteur sélectif de la COX-2. Cependant, cet inhibiteur n'a pas influencé la prolifération cellulaire. Comme il y a eu inhibition de la production de PGE₂ par le NS-398, tout porte à croire que la COX-2 est l'isoforme responsable de la synthèse de PGE₂ dans les kératinocytes canins. Denkert et al. (2001) sont parvenus à des résultats semblables avec des mélanomes humains. Ils ont démontré que l'inhibition de l'expression de la COX-2 et de la synthèse de la PGE₂ nécessitait une concentration moindre de NS-398 que l'inhibition de la COX-1, suggérant ainsi que l'effet de cet inhibiteur sur la production de PGE₂ est médié par l'inhibition de la COX-2. En ce qui concerne la prolifération cellulaire, nos résultats ont montré un

faible effet du NS-398. Ceci a aussi été démontré dans une publication récente, où des inhibiteurs de la COX-2 n'ont donné aucun effet réducteur sur la taille des mélanomes de souris (Cahlin et al., 2000). L'inhibition de la production de PGE₂ ne serait donc pas en corrélation avec l'inhibition de la prolifération, suggérant ainsi que les deux processus soient indépendants (Erickson et al., 1999).

À de faibles concentrations, le NS-398 et l'indométhacine peuvent inhiber la production de PGE₂. Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2, tel que le NS-398, inhibent l'activité cyclo-oxygénase mais pas l'activité peroxidase (Subbaramaiah et al., 1996) et ils induisent l'apoptose au niveau des cellules cancéreuses, par exemple dans le carcinome prostatique (Liu et al., 1998) et du côlon (Elder et al., 1997). Ils permettent également la sous-expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, qui est normalement induite par la PGE₂. Tout comme l'indométhacine, le NS-398 montre des effets antiprolifératifs sur les cellules cancéreuses gastriques et du côlon qui expriment fortement la COX-2 (Tsuji et al., 1996). Cependant, certaines études vont à l'encontre de nos résultats sur la prolifération. Cahlin et al. (2000) ont rapporté que l'inhibition de la production de PGE₂ par l'indométhacine dans des mélanomes de souris mène à diminution de la prolifération *in vivo*, tandis que l'indométhacine n'avait aucun effet inhibiteur sur la synthèse d'ADN dans les cellules tumorales *in vitro* (Lönnroth et al., 1995). L'apoptose accrue, en partie par la suppression de l'activité télomérase, peut donc être un mécanisme alternatif pour la croissance retardée des tumeurs suite à l'inhibition de la COX (Lönnroth et al., 1999 ; Ogino et al., 1999).

En résumé, notre étude démontre que la COX-2 est davantage induite dans les kératinocytes canins néoplasiques que dans les normaux *in vitro*. Cet enzyme est à la base de la production de PGs et son implication dans le cancer de la peau a été démontrée dans plusieurs études et chez plusieurs espèces. Les AINS pourraient être un moyen préventif et curatif pouvant être utilisés lors de CSC canins.

Conclusion

Le CSC est l'un des cancers de la peau les plus communs. Chez le chien, il représente la tumeur maligne la plus commune au niveau des doigts et la deuxième tumeur la plus courante de la cavité buccale. Plusieurs facteurs étiologiques ont été identifiés, mais il reste à élucider leurs rôles dans la pathogénèse de ce cancer. Plusieurs types de carcinomes de la peau ont été étudiés chez les humains et ces recherches ont démontré une forte expression de la COX-2. Cependant, seule la démonstration de la COX-2, et non la régulation de l'expression de cet enzyme, avait été montrée jusqu'à présent chez le chien.

Normalement, la COX-1 est exprimée de manière constitutive et dans la plupart des tissus, alors que la COX-2 est absente. Lors d'un développement tumoral, l'expression de la COX-2 augmente considérablement. Cette surexpression mène à une forte production de PGs, qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire, l'arrêt de l'apoptose et la suppression de la réponse immunitaire. Afin de prévenir les effets des PGs sur les kératinocytes, certains chercheurs ont trouvé des AINS qui réduisent les risques de propagation de la tumeur, et ce chez plusieurs espèces.

D'éventuelles recherches sur le promoteur de la COX-2 chez le chien pourraient potentiellement donner des résultats intéressants. De plus, l'utilisation d'AINS spécifiques à la COX-2 sur un modèle canin *in vivo* atteint d'un CSC permettrait de comprendre davantage le rôle de la COX-2. Comme nos lignées cellulaires proviennent de la muqueuse buccale, il serait également intéressant d'étudier le CSC canin provenant d'autres sites anatomiques. Le monde scientifique doit découvrir et comprendre encore davantage la COX pour parvenir éventuellement à une compréhension ultime de son rôle dans le CSC, de même que dans tout autre type de cancer.

Bibliographie

An K.P., Athar M., Tang X., Katiyar S.K., Russo J., Beech J., Aszterbaum M., Kopelovich L., Epstein E.H. Jr, Mukhtar H. et Bickers D.R., 2002. Cyclo-oxygenase-2 expression in murine and human nonmelanoma skin cancers: implications for therapeutic approaches. *Photochem Photobiol* 76(1): 73-80.

Aydin Y., Toplu N. et Alkan Z., 1997. Squamous cell carcinoma of the lung in a dog. *Aust Vet J* 75: 488-490.

Banny B.M. et Kennedy T.G., 1997. Regulation of cyclo-oxygenase gene expression in rat endometrial stromal cells: the role of epidermal growth factor. *Dev Genet* 21(1): 109-115.

Basu S., Rosenzweig K.R., Youmell M. et Price B.D., 1998. The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF kappa B following DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 79-83.

Battu S., Rigaud M. et Beneytout J.L., 1998. Resistance to apoptosis and cyclo-oxygenase-2 expression in a human adenocarcinoma cell line HT29 CL.19A. *Anticancer Res* 18(5A): 3579-3583.

Benjamin L.E. et Keshet E., 1997. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8761-8766.

Bjorkman D.J., 1996. The effect of aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drugs on prostaglandins. *Am J Med* 100(2A): 31S-36S.

Bornfeldt K.E., Campbell J.S., Koyama H., Argast G.M., Leslie C.C., Raines E.W., Krebs E.G. et Ross R., 1997. The mitogen-activated protein kinase pathway can mediate growth inhibition and proliferation in smooth muscle cells. Dependence on the availability of downstream targets. *J Clin Invest* 100, 875-885.

Buckman S.Y., Gresham A., Hale P., Hruza G., Anast J., Masferrer J. et Pentland A.P., 1998. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 19: 723-729.

Cahlin C., Gelin J., Delbro D., Lönnroth C., Doi C. et Lundholm K., 2000. Effect of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on tumor growth in mouse tumor models with or without cancer cachexia related to prostanoids. *Cancer Res* 60: 1742-1749.

Cao Y. et Prescott S.M., 2002. Many actions of cyclo-oxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 190(3): 279-286.

Capdevilla J.H., Flack J.R. et Harris R.C., 2000. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res* 41(2): 163-181.

Chan G., Boyle J.O., Yang E.K., Zhang F., Sacks P.G., Shah J.P., Edelstein D., Soslow R.A., Koki A.T., Woerner B.M., Masferrer J.L. et Dannenberg A.J., 1999. Cyclo-oxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 59(5): 991-994.

Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., et Simmons D.L., 2002. COX-3, a cyclo-oxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21): 13926-13931.

Chen G., Wood E.G., Wang S.H. et Warner T.D., 1999. Expression of cyclo-oxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells is unrelated to nuclear factor-kappaB activation. *Life Sci* 64(14): 1231-1242.

Chiabrando C., Brogginini M., Castagnoli M.N., Donelli M.G., Noseda A., Visintainer M., Garattini S. et Fanelli R., 1985. Prostaglandin and thromboxane synthesis by Lewis lung carcinoma during growth. *Cancer Res* 45(8): 3605-3608.

Chinery R., Beauchamp R.D., Shyr Y., Kirkland S.C., Coffey R.J. et Morrow J.D., 1998. Antioxidants reduce cyclo-oxygenase-2 expression, prostaglandin production, and proliferation in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 58: 2323-2327.

Cramer F.M., Varvayanis M., Cromie B.R., Rekers W.L. et Suter M.M., 1997. Serum-free conditions for the long term growth and differentiation of neoplastic canine keratinocytes. *Exp Dermatol* 6(3): 147-155.

Cross D.S., Platt J.L., Juhn S.K., Bach F.H. et Adams G.L., 1992. Administration of a prostaglandin synthetase inhibitor associated with an increased immune cell infiltrate in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 118: 526-528.

Dagli M.L., Calderado F.F., Silva M.T. et Guerra J.L., 1997. Squamous cell carcinoma of the renal pelvis with metastasis in a dog. *J Comp Pathol* 116: 397-402.

Denkert C., Kobel M., Berger S., Siegert A., Leclere A., Trefzer U. et Hauptmann S., 2001. Expression of cyclo-oxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 61(1): 303-308.

DeWitt D.L., 1991. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* 1083(2): 121-134.

DeWitt D.L. et Meade E.A., 1993. Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch Biochem Biophys* 306(1): 94-102.

Dhaliwal R.S., Kitchell B.E. et Maretta S.M., 1998. Oral tumors in dogs and cats. Pat I. Diagnosis and clinical signs. *Compend Continuing Educ* 20: 1011-1021.

Doré M., Lanthier I. et Sirois J., 2003. Cyclo-oxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 40(2): 207-212.

DuBois R.N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., Van de Putte L.B.A. et Lipsky P.E., 1998. Cyclo-oxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12 (12): 1063-1073.

Egan I.J., Sandborn W.J., Mays D.C., Tremaine W.J. et Lipsky J.J., 1999. Plasma and rectal adenosine in inflammatory bowel disease: effect of methotrexate. *Inflamm Bowel Dis* 5(3): 167-173.

EIAttar T.M.A., 1985. Cancer and the prostaglandins: a mini review on cancer research. *J Oral Pathol* 14(7): 511-522.

Elder D.J., Halton D.E., Hague A. et Paraskeva C., 1997. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclo-oxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res* 3(10): 1679-1683.

Erickson B.A., Longo W.E., Panesar N., Mazuski J.E. et Kaminski D.L., 1999. The effect of selective cyclo-oxygenase inhibitors on intestinal epithelial cell mitogenesis. *J Surg Res* 81(1):101-107.

Fierlbeck G., Rassner G. et Muller C., 1990. Psoriasis induced at the injection site of recombinant interferon gamma. Results of immunohistologic investigations. *Arch Dermatol* 126 (3): 315-355.

Fiorentino D.F., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann T.R., Howard M., Moore K.W. et O'Garra A., 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146: 3444.

Fischer S.M., 1997. Prostaglandins and cancer. *Front Biosci* 2: d482-500.

Fischer S.M., Lo H-H, Gordon G-B, Seibert K., Kelloff G., Lubet R.A. et Conti C.J., 1999. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclo-oxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against UV-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 25: 231-240.

Folkman J., 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependant? *J Natl Cancer Inst* 82: 4-6.

Fosslien E., 1998. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system. *Ann Clin Lab Sci* 28(2): 67-81.

Frantz M., Jung M.L., Ribereau-Gayon G. et Anton R., 2000. Modulation of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum glycoproteins. *Arzneimittelforschung* 50(5): 471-478.

Fujita T., Matsui M., Takaku K., Uetake H., Ichikawa W., Taketo M.M. et Sugihara K., 1998. Size- and invasion-dependant increase in cyclo-oxygenase 2 levels in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* 58(21): 4823-4826.

Fujita H., Koshida K., Keller E.T., Takahashi Y., Yoshimoto T., Namiki M et Mizokami A., 2002. Cyclo-oxygenase-2 promotes prostate cancer progression. *Prostate* 53: 232-240.

Gallo O., Franchi A., Magnelli L., Sardi I., Vannacci A., Boddi V., Chiarugi V. et Masini E., 2001. Cyclo-oxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 3: 53-61.

Gamblin R.M., Sagartz J.E. et Couto C.G., 1997. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *Am J Vet Res* 58: 857-863.

Giardiello F.M., Spannhake E.W., DuBois R.N., Hylind L.M., Robinson C.R., Hubbard W.C., Hamilton S.R. et Yang V.W., 1998. Prostaglandin levels in human colorectal mucosa: effects of sulindac in patients with familial adenomatous polyposis. *Dig Dis Sci* 43(2): 311-316.

Gierse J.K., McDonald J.J., Hauser S.D., Rangwala S.H., Koboldt C.M. et Seibert K., 1996. A single amino acid difference between cyclo-oxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem* 271(26): 15810-15814.

Goetzl E.J., An S. et Smith W.L., 1995a. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J* 9(11): 1051-1058.

Goetzl E.J., An S. et Zeng L., 1995b. Specific suppression by prostaglandin E₂ of activation-induced apoptosis of human CD4⁺CD8⁺ T lymphoblastes. *J Immunol* 154: 1041-1047.

Goldschmidt M.H. et Shofer F.S., 1992. Squamous cell carcinoma. In: Goldschmidt M.H., Shofer F.S., *Skin Tumors of the dog and cat*. Oxford: Pergamon Press, pp 37-49.

Greenlee R.T., Murray T., Bolden S. et Wingo P.A., 2000. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 50(1): 7-33.

Gresham A.J., Masferrer X., Chen S, Leal-Khoury S. et Pentland A.P., 1996. Increased synthesis of high-molecular-weight cPLA₂ mediates early UV-induced PGE₂ in human skin. *Am J Physiol* 270(4 Pt 1): C1037-1050.

Grewe M., Trefzer U., Ballhorn A., Gyufko K., Henninger H. et Krutmann J., 1993. Analysis of the mechanism of ultraviolet (UV) B radiation-induced prostaglandin E₂ synthesis by human epidermoid carcinoma cells. *J Invest Dermatol* 101(4): 528-531.

Hamberg M. et Samuelsson B., 1967. On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandins E-1 and F-1-alpha. *J Biol Chem* 242(22): 5336-5343.

Hao X., Bishop A.E., Wallace M., Wang H., Willcocks T.C., Maclouf J., Polak J.M., Knight S. et Talbot I.C., 1999. Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 187(3): 295-301.

Henry D., Lim L.L.-Y., Garcia Rodriguez L.A., Perez Gutthann S., Carson J.L., Griffin M., Savage R., Logan R., Moride Y., Hawkey C., Hill S. et Fries J.T., 1996. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. *BMJ* 312: 1563-1566.

Herschman H.R., 1996. Review: prostaglandin synthase-2. *Biochim Biophys Acta* 1299: 125-140.

Hida T., Leyton J., Makheja A.N., Ben-Av P., Hla T., Martinez A., Mulshine J., Malkani S., Chung P. et Moody T.W., 1998a. Non-small cell lung cancer cyclo-oxygenase activity and proliferation are inhibited by non-steroidal antiinflammatory drugs. *Anticancer Res* 18(2A): 775-782.

Hida T., Yatabe Y., Achiwa H., Muramatsu H., Kozaki K., Nakamura S., Ogawa M., Mitsudomi T., Sugiura T. et Takahashi T., 1998b. Increased expression of cyclo-oxygenase-2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 58: 3761-3764.

Higashi Y., Kanekura T. et Kanzaki T., 2000. Enhanced expression of cyclo-oxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer* 86(5): 667-671.

Hla T. et Neilson K., 1992. Human cyclo-oxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(16): 7384-7388.

Hla T., Bishop-Bailey D., Liu C.H., Schaeffers H.J. et Trifan O.C., 1999. Cyclo-oxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 551-557.

Hsu A.L., Ching T.T., Wang D.S., Song X., Rangnekar V.M. et Chen C.S., 2000. The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 275: 11397-11403.

Isoherranen K., Punnonen K., Jansen C. et Uotila P., 1999. Ultraviolet irradiation induces cyclo-oxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br J Dermatol* 140(6): 1017-1022.

Jeng J.H., Ho Y.S., Chan C.P., Wang Y.J., Hahn L.J., Lei D., Hsu C.C. et Chang M.C., 2000. Areca nut extract up-regulates prostaglandin production, cyclo-oxygenase-2 mRNA and protein expression of human oral keratinocytes. *Carcinogenesis* 21(7): 1365-1370.

Kaplan-Machlis B. et Klostermeyer B.S., 1999. The cyclo-oxygenase-2 inhibitors: safety and effectiveness. *Ann Pharmacother* 33(9): 979-988.

Kargman S.L., O'Neill G.P., Vickers P.J., Evans J.F., Mancini J.A. et Jothy S., 1995. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 55: 2556-2559.

Karmali R.A., Wustrow T., Thaler H.T. et Strong E.W., 1984. Prostaglandins in carcinomas of the head and neck. *Cancer Lett* 22(3): 333-336.

Kawamori T., Rao C.V., Seibert K. et Reddy B.S., 1998. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclo-oxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 58(3): 409-412.

Khan K.N., Stanfield K.M., Trajkovic D. et Knapp D.W., 2001. Expression of cyclo-oxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol* 38(1): 116-119.

Konger R.L., Malaviya R. et Pentland A.P., 1998. Growth regulation of primary human keratinocytes by prostaglandin E receptor EP2 and EP3 subtypes. *Biochim Biophys Acta* 1401(2): 221-234.

Kraegel S.A. et Madewell B.R., 2000. Tumors of the skin. In Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat. 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, pp. 524-528.

Kupper T.S., 1990. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculation. *J Clin Invest* 86(6): 1783-1789.

Kurumbail R.G., Stevens A.M., Gierse J.K., McDonald J.J., Stegeman R.A., Pak J.Y., Gildehaus D., Miyashiro J.M., Penning T.D., Seibert K., Isakson P.C. et Stallings W.C., 1996. Structural basis for selective inhibition of cyclo-oxygenase-2 by antiinflammatory agents. *Nature* 384(6610): 644-648.

Latimer K.S., Kaswan R.L. et Sundberg J.P., 1987. Corneal squamous cell carcinoma in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 190: 1430-1432.

Lau S.S., McMahon J.B., McMenamin M.G., Schuller H.M. et Boyd M.R., 1987. Metabolism of arachidonic acid in human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 47(14): 3757-3762.

Lawrence J.N. et Benford D.J., 1995. Comparison of tumour promoter-induced prostaglandin E2 release in human and rat keratinocytes. *Carcinogenesis* 16(5): 1247-1251.

Lazer E.S., Miao C.K., Cywin C.L., Sorcek R., Wong H.C., Meng Z., Potocki I., Hoermann M., Snow R.J., Tschantz M.A., Kelly T.A., McNeil D.W., Coutts S.J., Churchill L., Graham A.G., David E., Grob P.M., Engel W., Meier H. et Trummlitz G., 1997. Effect of structural modification of enol-carboxamide-type nonsteroidal antiinflammatory drugs on COX-2/COX-1 selectivity. *J Med Chem* 40(6): 980-989.

Lee M.R., Liou M.L., Liou Y.F., Yang Y.F. et Lai M.Z., 1993. cAMP analogs prevent activation-induced apoptosis of T cell hybridomas. *J Immunol* 151: 5208.

Leffell D., 2000. The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 42(1 Pt 2): S18-22.

Leong J., Hughes-Fulford M., Rakhlin N., Habib A., Maclouf J. et Goldyne M.E., 1996. Cyclo-oxygenases in human and mouse skin and cultured human keratinocytes: association of COX-2 expression with human keratinocyte differentiation. *Exp Cell Res* 224(1): 79-87.

Li T.K. et Fox S.B., 1993. Effect of prostaglandin E₂ (PGE₂) on IL-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by T helper cells. *J Immunol* 150: 1680-1690.

Lim J.T., Piazza G.A., Han E.K., Delohery T.M., Li H., Finn T.S., Buttyan R., Yamamoto H., Sperl G.J., Brendel K., Gross P.H., Pamukcu R. et Weinstein I.B., 1999. Sulindac derivatives inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 58(7): 1097-1107.

Lipsky L.P., Abramson S.B., Crofford L., Dubois R.N., Simon L.S. et van de Putte L.B., 1998. The classification of cyclo-oxygenase inhibitors. *J Rheumatol* 25(12): 2298-2303.

Liu B., Imar T., Howlett J., Diglio C. A. et Honn K. V., 1991. Lipoxygenase metabolites of arachidonic and linoleic acids modulate the adhesion of tumor cells to endothelium via regulation of protein kinase C. *Cell Regul* 2: 1045-1055.

Liu X.H., Yao S., Kirschenbaum A. et Levine A.C., 1998. NS398, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 58(19): 4245-4249.

Loll P.J., Picot D. et Garavito R.M., 1995. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nat Struct Biol* 2(8): 637-643.

Lönnroth C. S., Gelin G., Cahlin C., Iresjö B-M., Cvetkovska E., Edström S., Svanberg E. et Lundholm K., 1995. Effects related to indomethacin prolonged survival and decreased tumor growth in a mouse tumor model with cytokine dependent cancer cachexia. *Int J Oncol* 7: 1404-1413.

Lönnroth C., Anderson M., Iresjö B-M., Karlsson L. et Lundholm K., 1999. Indomethacin influences on telomerase activity in tumor-bearing mice and cells *in vitro*. *Miami Nature Biotechnology Short Reports* 10: 6-10.

Marks F., Müller-Decker K. et Fürstenberger G., 2000. A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Toxicology* 153(1-3): 11-26.

Marks R., 1995. An overview of skin cancers. *Cancer Suppl* 75: 607-612.

Marnett L.J., 1992. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 52(20): 5575-5589.

Marnett L.J., Rowlinson S.W., Goodwin D.C et Kalgutkar A.S. et Lanzo C.A., 1999. Arachidonic acid oxydation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem* 274(33): 22903-22906.

Masferrer J.L., Zweifel B.S., Manning P.T., Hauser S.D., Leahy K.M., Smith W.G., Isakson P.C. et Seibert K., 1994. Selective inhibition of inducible cyclo-oxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 3228-3232.

Matsuura H., Sakaue M., Subbaramaiah K., Kamitani H., Eling T.E., Dannenberg A.J., Tanabe T., Inoue H., Arata J. et Jetten A.M., 1999. Regulation of cyclo-oxygenase-2 by Interferon γ and Transforming growth factor α in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. *J Biol Chem* 274(41): 29138-29148.

McEntee M.F., Cates J.M. et Neilsen N., 2002. Cyclo-oxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Vet Pathol* 39(4): 428-436.

Minter H.A., Eveson J.W., Huntley S., Elder D.J.E. et Hague A., 2003. The cyclo-oxygenase 2-selective inhibitor NS398 inhibits proliferation of oral carcinoma cell lines by mechanisms dependent and independent of reduced prostaglandin E_2 synthesis. *Clin Cancer Res* 9: 1885-1897.

Morita I., Schindler M., Regier M.K., Otto J.C., Hori T., DeWitt D.L. et Smith W.L., 1995. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270 (18): 10902-10908.

Müller-Decker K., Scholz K., Marks F. et Fürstenberger G., 1995. Differential expression of prostaglandin H synthase isozymes during multistage carcinogenesis in mouse epidermis. *Mol Carcinog* 12(1): 31-41.

Müller-Decker K., Kopp-Schneider A., Marks F., Seibert K. et Fürstenberger G., 1998a. Localization of prostaglandin H synthase isoenzymes in murine epidermal tumors: suppression of skin tumor promotion by inhibition of prostaglandin H synthase-2. *Mol Carcinog* 23(1): 36-44.

Müller-Decker K., Scholz K., Neufang G., Marks F. et Fürstenberger G., 1998b. Localization of prostaglandin-H Synthase-1 and -2 in mouse skin: Implications for Cutaneous function. *Exp Cell Res* 242(1): 84-91.

Müller-Decker K., Reinerth G., Krieg P., Zimmermann R., Heise H., Bayerl C., Marks F. et Fürstenberger G., 1999. Prostaglandin-H-Synthase isozyme expression in normal and neoplastic human skin. *J Cancer* 82(5): 648-656.

Murata H., Kawano S., Tsuji S., Tsuji M., Sawaoka H., Kimura Y., Shiozaki H. et Hori M., 1999. Cyclo-oxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 94(2): 451-455.

Narumiya S., Hirata N., Namba T., Hayashi Y., Ushikubi F., Sugimoto Y., Negishi M. et Ichikawa A., 1993. Structure and function of prostanoid receptors. *J Lip Med* 6: 155.

Needleman P. et Isakson P.C., 1998. Selective inhibition of cyclo-oxygenase 2. *Sci Med*: 26-35.

Negishi M., Sugimoto Y. et Ichikawa A., 1993. Prostanoid receptors and their biological actions. *Prog Lipid Res* 32(4): 417-434.

Neufang G., Fürstenberger G., Heidt M., Marks F. et Müller-Decker K., 2001. Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclo-oxygenase-2 in skin. *PNAS* 98(13): 7629-7634.

Newton R., Seybold J., Kuitert L.M., Bergmann M. et Barnes P.J., 1998. Repression of cyclo-oxygenase-2 and prostaglandin E₂ release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem* 273(48): 32312-32321.

Nickoloff B.J., 1991. The cytokine network in psoriasis. *Arch Dermatol* 127(6): 871-884.

Nickoloff B.J., Mitra R.S., Elder J.T., Fisher G.J. et Voorhees J.J., 1989. Decreased growth inhibition by recombinant gamma interferon is associated with increased transforming growth factor-alpha production in keratinocytes cultured from psoriatic lesions. *Br J Dermatol* 121(2): 161-174.

Nikula K.H., Benjamin S.A., Angleton G.M., Saunders W.J. et Lee A.C., 1992. Ultraviolet radiation, solar dermatosis, and cutaneous neoplasia in beagle dogs. *Radiat Res* 129: 11-18.

Nishimura G., Yanoma S., Mizuro H., Kawakami K. et Tsukuda M., 1999. A selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor suppresses tumor growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous carcinomas cells. *Jpn J Cancer Res* 90(10): 1152-1162.

O'Brien M.G., Berg J. et Engler S.J., 1992. Treatment by digital amputation of subungual squamous cell carcinoma in dogs: 21 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 201: 759-761.

O'Mahony C.A., Beauchamp R.D., Albo D., Tsujii M., Sheng H.M., Shao J., Dubois R.N. et Berger D.H., 1999. Cyclo-oxygenase-2 alters transforming growth factor-beta 1 response during intestinal tumorigenesis. *Surgery* 126(2): 364-370.

O'Neill G.P., Kennedy B.P., Mancini J.A, Kargman S., Ouellet M., Yergey J., Falguyret J.P., Cromlish W.A., Payette P., Chan C.C., Culp S.A., Vincent C., Boily C., Abramovitz M., Evans J.F., Ford-Hutchinson A.W., Vickers P.J. et Percival M.D., 1995. Selective inhibitors of COX-2. *Agents Actions Suppl* 46: 159-168.

Ogino M., Hisatomi H. et Hanazono M., 1999. Effectiveness of indomethacin as an antitumor agent in Colon 26-bearing conventional and nude mice, and telomerase activity in the tumors. *J Exp Anim Sci* 48: 15-21.

Oh S.K., Kim S.H. et Walker J.E., 1990. Interference with immune response at the level of generating effector cells by tumor-associated haptoglobin. *J Natl Cancer Inst* 82: 934-940.

Oshima M., Dinchuk J.E., Kargman S.L., Oshima H., Hancock B., Kwong E., Trzaskos J.M., Evans J.F. et Taketo M.M., 1996. Suppression of intestinal polyposis in Apc delra 716 knockout mice by inhibition of cyclo-oxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87(5): 803-809.

Panje W.R., 1981. Regression of head and neck carcinoma with a prostaglandin-synthesis inhibitor. *Arch otolaryngol* 107: 658-663.

Parkinson E.K., Pera M.F., Emmerson A. et Gorman P.A., 1984. Differential effects of complete and second-stage tumour promoters in normal but not transformed human and mouse keratinocytes. *Carcinogenesis* 5: 1071-1077.

Parrett M.L., Harris R.E., Joarder F.S., Ross M.S., Clausen K.F. et Robertson F.M., 1997. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol* 10: 503-507.

Penning T.D., Talley J.J., Bertenshaw S.R., Carter J.S., Collins P.W., Docter S., Graneto M.J., Lee L.F., Malecha J.W., Miyashiro J.M., Rogers R.S., Rogier D.J., Yu S.S., Anderson G.S., Burton E.G., Cogburn J.N., Gregory S.A., Koboldt C.M., Perkins W.E., Seibert K., Veenhuizen A.W., Zhang Y.Y. et Isakson P.C., 1997. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclo-oxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide(SC-58635,celecoxib). *J Med Chem* 40: 1347-1365.

Pentland A.P. et Needleman P.J., 1986. Modulation of keratinocyte proliferation *in vitro* by endogenous prostaglandins. *J Clin Invest* 77(1): 246-251.

Pentland A.P., Mahoney M., Jacobs S.C. et Holtzman M.J., 1990. Enhanced prostaglandin synthesis after ultraviolet injury is mediated by endogenous histamine stimulation : a mechanism for irradiation erythema. *J Clin Invest* 86: 566.

Pentland A.P., Schoggins J.W., Scott G.A., Khan K.N.M. et Han R., 1999. Reduction of UV-induced shin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis* 20(10): 1939-1944.

Perkins N.D., 1997. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 29(12): 1433-1448.

Perkins D.J. et Kniss D.A., 1997. Tumor necrosis factor-alpha promotes sustained cyclo-oxygenase-2 expression: attenuation by dexamethasone and NSAIDs. *Prostaglandins* 54(4): 727-743.

Pestili de Almeida E.M., Piché C., Sirois J. et Doré M., 2001. Expression of Cyclo-oxygenase in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem* 49: 867-875.

Phipps R.P., Stein S.H. et Roper R.L., 1991. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 12 : 349.

Picot D., Loll P.J. et Garavito R.M., 1997. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 367(6460): 243-249.

Plescia O.J., Smith A.H. et Greinwich K., 1975. Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandin. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(5): 1848-1851.

Plescia O.J., Grinwich K. et Plescia A.M., 1976. Subversive activity of syngeneic tumor cells as an escape mechanism from immune surveillance and the role of prostaglandins. *Ann NY Acad Sci* 276: 455-465.

Radinsky R., Risin S., Fan D., Dong Z., Bielenberg D., Bucana C. et Fidler I., 1995. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1(1): 19-31.

Ranelletti F.O., Almadori G., Rocca B., Ferrandina G., Ciabattini G., Habib A., Galli J., Maggiano N., Gessi M. et Lauriola L., 2001. Prognostic significance of cyclo-oxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 95(6): 343-349.

Rao, C.V., Tokumo K., Rigotty J., Zang E., Kelloff G. et Reddy B.S., 1991. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary administration of piroxicam, alpha-difluoromethylornithine, 16 alpha-fluoro-5-androsten-17-one, and ellagic acid individually and in combination. *Cancer Res* 51: 4528-4534.

Reddy B., Rao S., Rivenson C.V. et Kelloff G., 1993. Inhibitory effects of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis (Lond.)* 14: 1493-1497.

Reeve J.A. et DeForest M.E., 1988. The Canadian Kennel Club Book of Dogs. Toronto, Stoddart Publishing.

Rivas J.M. et Ullrich S.E., 1992. Systemic suppression of DTH by supernatants from UV-irradiated keratinocytes: an essential role for interleukin 10. *J Immunol* 149: 3865.

Roper R.L. et Phipps R.P., 1992. Prostaglandin E₂ and cAMP inhibit B lymphocyte activation and simultaneously promote IgE and IgG1 synthesis. *J immunol* 149 : 2984.

Rowe, E., Carroll R.J., et Day C.L., 1992. Prognostic factors for local recurrence, metastasis and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear and lip. *J Am Acad Dermatol* 26: 976-990.

Rys-Sikora K.E., Konger R.L., Schoggins J.W., Malaviya R. et Pentland A.P., 2000. Coordinate expression of secretory phospholipase A₂ and cyclo-oxygenase-2 in activated human keratinocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(4): C822-833.

Salasche S.J., 2000. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 42(1 Pt 2): 4-7.

Sano H., Kawahito Y., Wilder R.L., Hashiramoto A., Mukai S., Asai K., Kimura S., Kondo M. et Hla T., 1995. Expression of cyclo-oxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 3785-3789.

Saunders N.A. et Jetten A.M., 1994. Control of growth regulatory and differentiation-specific genes in human epidermal keratinocytes by interferon gamma. Antagonism by retinoic acid and transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem* 269(3) : 2016-2022.

Scholz K., Furstenberger G., Muller-Decker K. et Marks F., 1995. Differential expression of prostaglandin-H synthase isoenzymes in normal and activated keratinocytes *in vivo* and *in vitro*. *Biochem J* 309 (Pt 1): 263-269.

Scorrano L., Penzo D., Petronilli V., Pagano F. et Bernardi P., 2001. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor-alpha apoptotic signaling. *J Biol Chem* 276(15): 12035-12040.

Seibert K., Zhang Y., Leary K., Hauser S., Masferrer J., Perkins W., Lee L. et Isakson P., 1994. Pharmacology and biochemical demonstration of the role of cyclo-oxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci* 91: 12013-12017.

Shamma A., Yamamoto H., Doki Y., Okami J., Kondo M., Fujiwara Y., Yano M., Inoue M., Matsuura N., Shiozaki H. et Monden M., 2000. Up-regulation of cyclo-oxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 6(4): 1229-1238.

Sheng H., Shao J., Kirkland S.C., Isakson P., Coffey R.J., Morrow J., Beauchamp R.D. et DuBois R.N., 1997. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclo-oxygenase-2. *J Clin Invest* 99(9): 2254-2259.

Sheng W.L., Williams C.S., Shao J., Liang P., DuBois R.N. et Beauchamp R.D., 1998. Induction of cyclo-oxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 273(34): 22120-22127.

Shiotani H., Denda A., Yamamoto K., Kitayama W., Endoh T., Sasaki Y., Tsutsumi N., Sugimura M. et Konishi Y., 2001. Increased expression of cyclo-oxygenase-2 protein in 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinomas and chemopreventive efficacy of a specific inhibitor, nimesulide. *Cancer Res* 61(4): 1451-1456.

Shreedhar V., Giese T., Sung V.W et Ullrich S.E., 1998. A cytokine cascade including prostaglandin E₂, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol* 160: 3783-3789.

Smith W.L., Garavito R.M. et DeWitt D.L., 1996. Prostaglandin endoperoxide-H synthase (cyclo-oxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271(52): 33157-33160.

Snijdewint F.G., Kalinski P., Wierenga E.A., Bos J.D. et Kapsenberg M.L., 1993. Prostaglandin E₂ differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol* 150(12): 5321-5329.

Snyderman C.H., Klapan I., Milanovich M., Heo D.S., Wagner R., Schwartz D., Johnson J.T. et Whiteside T.L., 1994. Comparison of *in vivo* and *in vitro* prostaglandin E₂ production by squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 111(3 Pt 1): 189-196.

Steinbach G., Lynch P.M., Phillips R.K.S. et Wallace M.H., Hawk E., Gordon G.B., Wakabayashi N., Saunders B., Shen Y., Fujimura T., Su L.K. et Levin B., 2000. The effect of celecoxib, a cyclo-oxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342: 1946-1952.

Subbaramaiah K., Telang N., Ramonetti J.T., Araki R., DeVito B., Weksler B.B. et Dannenberg A.J., 1996. Transcription of cyclo-oxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 56: 4424-4429.

Subbaramaiah K., Telang N., Bansal M.B., Weksler B.B. et Dannenberg A.J., 1997a. Cyclo-oxygenase-2 gene expression is upregulated in transformed mammary epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 833: 179-185.

Subbaramaiah K., Zakim D., Weksler B.B. et Dannenberg A.J., 1997b. Inhibition of cyclo-oxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 201-210.

Subbaramaiah K., Chung W.J., Michaluart P., Telang N., Tanabe T., Inoue H., Jang M., Pezzuto J.M. et Dannenberg A.J., 1998. Resveratrol inhibits cyclo-oxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 273(34): 21875-21882.

Subbaramaiah K., Altorki N., Chung W.J., Mestre J.R., Sampa A. et Dannenberg A.J., 1999. Inhibition of cyclo-oxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 274: 10911-10915.

Sunder-Plabmann R., Majdic O., Knapp W. et Holter W., 1991. *In vitro* and *in vivo* activated T cells display increased sensibility t PGE₂. *Cell Immunol* 138: 289-299.

Takahashi S., Shigeta J., Inoue H., Tanabe T. et Okabe S., 1998. Localization of cyclo-oxygenase-2 and regulation of its mRNA expression in gastric ulcers in rats. *Am J Physiol* 275(5 Pt 1): G1137-1145.

Tang D.G., Renaud C., Stojakovic S., Diglio C.A., Porter A. et Honn K.V., 1995. 12(S)-HETE is a mitogenic factor for microvascular endothelial cells: its potential role in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 211: 462-468.

Teifke J.P. et Lohr C.V., 1996. Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin embedded squamous cell carcinomas of cattle, horses, cats and dogs. *J Comp Pathol* 114(2): 205-210.

Tizard I.R., 1996. Veterinary immunology : an introduction. Dans W.B. Saunders Company, 5e Ed., Philadelphia, Pennsylvania, pp 47-78.

Tjandrawinata R.R., Dahija R. et Hughes-Fulford M., 1997. Induction of cyclo-oxygenase-2 mRNA by prostaglandin E₂ in human prostatic carcinoma cells. *Br J Cancer* 75(8): 1111-1118.

Tremblay C., Doré M., Bochsler P.N. et Sirois J., 1999. Induction of prostaglandin G/H Synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 91(16): 1398-1403.

Tsuji S., Kawano S., Sawaoka H., Takei Y., Kobayashi I., Nagano K., Fusamoto H. et Kamada T., 1996. Evidences for involvement of cyclo-oxygenase-2 in proliferation of two gastrointestinal cancer cell lines. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55(3): 179-83.

Tsujii M. et DuBois R.N., 1995. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83: 493-502.

Tsujii M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M. et DuBois R.N., 1998. Cyclo-oxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer. *Cell* 93(5): 705-716.

Ueda M., Kokura S., Imamoto E., Naito Y., Handa O., Takagi T., Yoshida N et Yoshikawa T., 2003. Blocking of NK- κ B activation enhances the tumor necrosis factor α -induced apoptosis of a human gastric cancer cell line. *Cancer letter* 193: 177-182.

Ullrich S.E., 1995. The role of epidermal cytokines in the generation of cutaneous immune reactions and ultraviolet radiation induced immune suppression. *Photochem Photobiol* 62: 389.

Valentich J.D., Saada J.I. et Powell D.W., 1995. Synergistic activation of cyclo-oxygenase gene expression by interleukin-1 and aspirin. *Gastroenterology* 108: A932.

van der Ouderaa F.J., Buytenhek M., Slikkerveer F.J. et van Dorp D.A., 1979. On the haemoprotein character of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Biochim Biophys Acta* 572: 29-42.

Vanderveen E.E., Grekin R.C., Swanson N.A. et Kragballe K., 1986. Arachidonic acid metabolites in cutaneous carcinomas. Evidence suggesting that elevated levels of prostaglandins in basal cell carcinomas are associated with an aggressive growth pattern. *Arch Dermatol* 122(4): 407-412.

Vane J.R. et Botting R.M., 1997. Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Semin Arthritis Rheum* 26(6 suppl 1): 2-10.

Vane J.R., Bakhle Y.S. et Botting R.M., 1998. Cyclo-oxygenase-1 and 2. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 38: 97-120.

Wang H.Q., Kim M.P., Tiano H.F., Langenbach R. et Smart R.C., 2001. Protein kinase C- α coordinately regulates cytosolic phospholipase A₂ activity and the expression of cyclo-oxygenase-2 through different mechanisms in mouse keratinocytes. *Mol Pharmacol* 59 (4): 860-866.

Warner T.D., Giuliano F., Vojnovic I., Bukasa A., Mitchell J.A. et Vane J.R., 1999. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(13): 7563-7568.

Williams C.S. et DuBois R.N., 1996. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 270(3 Pt 1): G393-400.

Williams C.S., Mann M. et DuBois R.N., 1999. The role of the cyclo-oxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 18(55): 7908-7916.

Williams C.S., Tsujii M., Reese J., Dey S.K. et DuBois R.N., 2000. Host cyclo-oxygenase-2 modulates carcinomas growth. *J Clin Invest* 105: 1589-1594.

Xu X.M., Sansores-Garcia L., Chen X.M., Matijevic-Aleksic N., Du M. et Wu K.K., 1999. Suppression of inducible cyclo-oxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(9): 5292-5297.

Yarosh D., Both D., Kibitel J., Anderson C., Elmands C., Brash D. et Brown D., 2000. Regulation of TNFalpha production and release in human and mouse keratinocytes and mouse skin after UV-B irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16(6): 263-270.

Yoshimi N., Kawabata K., Hara A., Matsunaga K., Yamada Y. et Mori H., 1997. Inhibitory effect of NS-398, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, on azoxymetane-induced aberrant crypt foci in colon carcinogenesis of F344 rats. *Jpn J Cancer Res* 88(11): 1044-1051.

Yoshimura R., Sano H., Masuda C., Kawamura M., Tsubouchi Y., Chargui J., Yoshimura N., Hla T. et Wada S., 2000. Expression of cyclo-oxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer (Phila.)* 89: 58-596.

Young M.R. et Knies S., 1984. Prostaglandin E production by Lewis lung carcinoma: mechanism for tumor establishment *in vitro*. *J Natl Cancer Inst* 72(4): 919-922.

Zimmermann K.C., Sarbia M., Weber A.A., Borchard F., Gabbert H.E. et Schror K., 1999. Cyclo-oxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 59(1): 198-204.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant Nadia Pronovost		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Pathologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Nadia Pronovost, Maya M. Suter, Eliane Mueller, Jean Sirois et Monique Doré	
Titre Expression and Regulation of Cyclooxygenase-2 in Normal and Neoplastic Canine Keratinocytes.	
Revue Veterinary and Comparative Oncology	Date de publication En préparation

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Nadia Pronovost inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur Maya M. Suter	Signature [REDACTED]	Date 15.8.03
Coauteur Eliane Mueller	Signature [REDACTED]	Date 20.8.03
Coauteur Jean Sirois	Signature [REDACTED]	Date 24/08/03
Coauteur Monique Doré	Signature [REDACTED]	Date 27/8/03
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS à

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001