

Université de Montréal

Expression et régulation de la cyclooxygénase-2 dans les cellules mammaires  
canines normales et néoplasiques *in vitro*

par

Mélanie Brunelle

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

©Mélanie Brunelle, 2003



SF  
607  
U54  
2003  
v.021

**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 :  
Expression et régulation de la cyclooxygénase-2 dans les cellules mammaires  
canines normales et néoplasiques *in vitro*

Présenté par :  
Mélanie Brunelle

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Christiane Girard  
Présidente-rapporteuse

Dre Monique Doré  
Directrice de recherche

Dr Jean Sirois  
Codirecteur de recherche

Dr Bertrand Lussier  
Membre du jury

Mémoire accepté le :

## Résumé

Les tumeurs mammaires sont les néoplasmes les plus communs rencontrés chez les chiennes, représentant environ 50% de tous les néoplasmes. La moitié de ces tumeurs mammaires sont malignes et peuvent métastaser. L'induction de l'enzyme clé de la régulation de la biosynthèse des prostaglandines, la cyclooxygénase-2 (COX-2) a été démontrée dans de nombreux cancers chez l'humain et le chien, incluant les tumeurs malignes mammaires. L'objectif de cette étude était de caractériser la régulation et l'expression de la COX-2 dans des cellules épithéliales mammaires canines normales et néoplasiques *in vitro*. Des lignées cellulaires ont été cultivées en absence ou en présence d'agonistes; des immunobuvardages, de l'immunocytologie, des dosages radioimmunologiques et des tests de prolifération cellulaire ont été utilisés pour étudier l'expression de la COX-2, la production de PGE<sub>2</sub> et son implication dans la carcinogenèse. Les résultats ont démontré que certaines lignées cellulaires néoplasiques expriment plus fortement la COX-2 comparativement aux cellules normales. En particulier la lignée cellulaire CMT12 surexprime constitutivement la COX-2. Dans toutes les lignées cellulaires étudiées, la COX-2 et la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> ont diminué suite à la culture sans sérum alors qu'une stimulation au PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) a induit la COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub>. Dans toutes les lignées cellulaires, la prolifération cellulaire et la production de PGE<sub>2</sub> ont été inhibées par des inhibiteurs spécifiques ou non de la COX-2. Ces résultats indiquent qu'une des lignées cellulaires épithéliales mammaires néoplasiques canines surexprime la COX-2 et produit une quantité considérable de PGE<sub>2</sub>, que l'activité enzymatique

de la COX-2 et la prolifération peuvent être diminuées par des inhibiteurs de la COX-2, suggérant ainsi que la COX-2 joue un rôle dans l'oncogénèse mammaire canine.

Mots clés : Cyclooxygénase-2, Prostaglandine G/H synthétase-2, tumeur maligne mammaire, prostaglandines, cellules mammaires, chiens.

## Summary

Mammary malignant tumors are the most common tumor in female dogs. Induction of cyclooxygenase-2 (COX-2), a key enzyme in prostaglandins biosynthesis, has been demonstrated in various cancers in humans and dogs, including mammary cancer. The objective of this study was to characterize COX-2 regulation and expression in canine mammary epithelial cells *in vitro*. Several cell lines derived from normal and neoplastic canine mammary glands were cultured in the absence or presence of agonists, and immunoblots, immunocytochemistry, radioimmunoassays and cell proliferation assays were used to study COX-2 expression and PGs production. Results showed that the neoplastic cell line CMT12 constitutively overexpress COX-2 protein while the other cell lines expressed low basal levels of COX-2 protein. In all cell lines studied, COX-2 decreased in a time-dependent manner with serum starvation, and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) stimulation induced a time-dependent increase in COX-2 protein, with the highest induction observed in CMT12. PGE<sub>2</sub> production was higher in CMT12 compared to other cell lines. In all cell lines, proliferation and PGE<sub>2</sub> production could be inhibited by specific and non-specific COX-2 inhibitors. These results indicate that some neoplastic canine mammary cell lines overexpress COX-2, and that COX-2 inhibition decreases cell proliferation and PGE<sub>2</sub> production, suggesting a role for COX-2 in canine mammary oncogenesis.

Keywords: Cyclooxygenase-2, Prostaglandin G/H synthase-2, mammary tumor, prostaglandins, mammary cells, dogs.

# Table des matières

	<b>Page</b>
Résumé.....	iii
Summary.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
Recension de la littérature.....	3
1. Les tumeurs malignes mammaires chez le chien.....	3
1.1 Les facteurs de risques.....	4
1.1.1 L'âge.....	4
1.1.2 Les hormones.....	4
1.1.3 La race.....	6
1.1.4 Les facteurs nutritionnels.....	6
1.1.5 Les modifications génétiques.....	7
2. La cascade de l'acide arachidonique.....	8
2.1 Les prostanoides et leurs fonctions.....	10
2.1.1 Fonctions physiologiques des prostanoides.....	10
2.1.2 Fonctions des prostanoides lors de pathologie.....	11



2.1.3 Les récepteurs de la PGE <sub>2</sub> .....	13
3. La cyclooxygénase (COX).....	14
3.1 La COX-1.....	15
3.2 La COX-2.....	16
3.2.1 La régulation de la COX-2.....	17
3.2.2 Les rôles biologiques de la COX-2.....	18
4. Expression de la COX dans les tumeurs.....	19
4.1 La COX-2 et la carcinogenèse.....	22
4.1.1 La COX-2 et l'angiogenèse.....	22
4.1.2 La COX-2 et le système immunitaire.....	23
4.1.3 La COX-2 et l'apoptose.....	24
4.1.4 La COX-2 et la formation d'agents mutagènes.....	25
4.1.5 Modèle génétique de l'implication de la COX-2 dans la carcinogenèse.....	25
4.2 La COX -2 et les tumeurs malignes mammaires.....	26
5. Les anti-inflammatoire non-stéroïdiens (AINS).....	30
5.1 Effet analgésique, anti-inflammatoire, antipyrétique et antithrombotique.....	30
5.2 Effet anticancer.....	31
5.2.1 Les AINS sélectifs à la COX-2.....	33
Objectif.....	37
Article : Expression of Cyclooxygenase-2 in canine mammary tumors.....	38
Discussion.....	81

Conclusion.....	87
Bibliographie.....	89

# Liste des tableaux

Page

## Recension de la littérature

Tableau I : Sommaire des différences entre les deux isoformes de la COX.....	21
Tableau II : Sélectivité de différents AINS pour la COX-1 et la COX-2.....	36

# Liste des figures

Page

## Recension de la littérature

Figure 1 : Voie métabolique de l'acide arachidonique..... 12

## Articles

Figure 1 : COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> synthesis in normal and neoplastic canine mammary epithelial cells..... 68

Figure 2 : Effect of serum deprivation on COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> synthesis in normal and neoplastic canine mammary epithelial cells..... 70

Figure 3 : Time-dependent induction of COX-2 protein and PGE<sub>2</sub> synthesis by PMA in normal and neoplastic canine mammary epithelial cells..... 72

Figure 4 : Time-dependent induction of COX-2 mRNA by PMA in CMT12 cells..... 74

Figure 5 : Immunocytochemical detection of COX-2 in normal and neoplastic canine mammary epithelial cells..... 76

Figure 6 : Effect of COX inhibition on PGE<sub>2</sub> synthesis by canine neoplastic mammary epithelial cells..... 78

Figure 7 : Effect of COX inhibition on cell proliferation of neoplastic canine mammary epithelial cells..... 80

## Liste des sigles et abréviations

COX : cyclooxygénase

PDGF : platelet-derived growth factor

(facteur de croissance dérivé des plaquettes)

BFGF : basic fibroblast growth factor (facteur de croissance de fibroblastes)

BRCA : breast cancer gene (gène de susceptibilité au cancer du sein)

VEGF : vascular endothelial growth factor

(facteur de croissance endothélial vasculaire)

PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>

AINS : anti-inflammatoire non-stéroïdien

KDa : kilodalton

PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate

EGF : epidermal growth factor (facteur de croissance de l'épiderme)

PGE<sub>2</sub> : prostaglandine E<sub>2</sub>

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

TXA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub>

LPS : lipopolysaccharides

Il-1 $\alpha$  et  $\beta$  : interleukine-1 $\alpha$  et  $\beta$

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$  (facteur onconécrosant- $\alpha$ )

TGF- $\beta$  : transforming growth factor- $\beta$  (facteur de croissance transformant)

iNOS : synthétase oxide nitrique

INF : interféron

PAF : platelet activating factor (facteur d'activation plaquettaire)

## Remerciements

Je souhaite remercier sincèrement la Dre. Monique Doré pour son accessibilité, son écoute, sa compréhension et ses encouragements durant mes recherches. Merci aux Dre. Monique Doré et Dr. Jean Sirois pour m'avoir guidée dans le déroulement et la compréhension de mes recherches scientifiques.

Je suis aussi très reconnaissante envers Nadine Bouchard et Danielle Rannou pour leur aide technique et leur présence dans mon apprentissage.

Merci à Nadia Pronovost pour nos discussions à propos de la COX-2 et nos conversations très enrichissantes sur ce sujet et sur beaucoup d'autres...

Une immense gratitude pour David Ferland qui m'a encouragée dans les heureux et difficiles moments de mes études depuis 7 ans. Sans sa présence, je ne sais pas comment j'aurais fait pour avoir un si bon équilibre émotionnel.

Finalement, je voudrais remercier l'American Kennel Club/Canine Health Foundation et le Conseil de recherche en Sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour leur soutien financier.

## Introduction

Les tumeurs mammaires sont fréquemment diagnostiquées chez les chiennes et représentent près de la moitié de tous les néoplasmes chez cette espèce (Moulton, 2000; Misdorp et al., 1999). De nombreuses tumeurs mammaires canines sont bénignes mais une proportion considérable, 50% d'entre elles, sont malignes et possèdent le pouvoir dévastateur de métastaser (Moulton, 1990). Plusieurs facteurs ont été reliés à la tumorigénèse mammaire chez l'espèce canine et nombreux d'entre eux sont aussi des facteurs reliés au cancer du sein chez la femme. L'importance des hormones stéroïdiennes est clairement soulignée par une diminution de l'incidence et des risques des tumeurs malignes mammaires chez la chienne et la femme suite à l'ovariectomie en très jeune âge (Frye et al., 1967; Schneider et al., 1969). L'âge (Cohen et al., 1974), le sexe (Moulton, 1990), la diète (Sonnenschien et al., 1991; Pérez Alenza et al., 1998), les anomalies génétiques du gène p53 (Muto et al., 2000) sont aussi des facteurs importants et démontrés comme étant reliés à la carcinogénèse mammaire canine et humaine.

Les prostaglandines (PGs) sont des éléments essentiels pour le maintien de l'homéostasie cellulaire lorsque produites en quantité contrôlée et suffisante. Cependant, elles peuvent causer des problèmes dans l'équilibre cellulaire lorsqu'il y a modification de leur biosynthèse. L'enzyme responsable de la synthèse des PGs à partir de l'acide arachidonique est la cyclooxygénase (COX), dont il existe deux isoformes, la COX-1 et la COX-2 (DeWitt et al., 1993). Ces deux isoformes sont en plusieurs points différentes. La COX-1 est une protéine exprimée continuellement et en faible quantité dans la majorité des tissus et est impliquée



dans le maintien des fonctions de base des cellules. La COX-2 quant à elle n'est pas exprimée dans la majorité des tissus normaux. Elle possède des mécanismes de régulation lui permettant d'être rapidement induite par un grand nombre de stimuli pour produire de grandes quantités de PGs rapidement. La production de PGs, majoritairement PGE<sub>2</sub>, et l'induction de la COX-2 sont deux déterminants qui ont suscité de nombreuses recherches car il s'agirait d'éléments clé impliqués dans la carcinogénèse autant humaine qu'animale.

Contrairement au cancer du sein où les études suggèrent fortement un rôle pour la COX-2 dans la pathogénie de ces tumeurs, peu d'informations sont présentement disponibles sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la carcinogénèse des tumeurs mammaires de l'espèce canine. Une étude immunohistochimique a récemment démontré l'implication probable de la COX-2 dans certains carcinomes mammaires canins (Doré et al., 2003).

## Recension de la littérature

### 1. Les tumeurs malignes mammaires chez le chien

Les tumeurs mammaires sont les néoplasmes les plus communs chez les chiennes, représentant 50% de tous les néoplasmes (Moulton et al., 1990; Hampe et Misdorp, 1974). La moitié de ces tumeurs sont malignes et possèdent le pouvoir de métastaser (Brodey et al., 1983). Les métastases sont retrouvées aux nœuds lymphatiques et aux poumons alors que le rein, le cœur, le foie, les surrénales, les os et le cerveau sont des sites moins fréquents (Filder et Brodey, 1967; Krook, 1954). Bien que les carcinomes mammaires soient des néoplasmes majoritairement rencontrés chez la chienne, l'incidence de ces tumeurs chez le mâle est évaluée entre 0 et 2.7% (Brodey et al. 1966).

Une étude comparant l'incidence des tumeurs malignes mammaires chez la chienne avec celle du cancer du sein révèle que les tumeurs malignes mammaires canines est trois fois plus fréquent que le cancer du sein (Martin et al., 1984). Selon l'American Cancer Society, si l'on exclut le cancer de la peau, le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué chez la femme et est la seconde cause de mortalité par cancer des femmes américaines âgées de 40-50 ans après le cancer des poumons (Singletary et al., 1998).

## **1.1 Les facteurs de risque**

Il existe certains facteurs de risque reliés aux tumeurs malignes mammaires chez l'espèce canine. L'âge, la race de l'animal (Moulton, 1990), les hormones (telles que les œstrogènes et la progestérone) (Hamilton, 1974), la diète (Sonnenschien et al., 1991; Pérez Alenza et al. 1998), la race (Moulton, 1990) et certaines modifications génétiques (Muto et al., 2000) sont les principaux facteurs associés aux tumeurs malignes mammaires chez la chienne. Il est intéressant de noter que plusieurs de ces facteurs sont aussi reliés au cancer du sein chez la femme (Raynaud et al., 1981).

### **1.1.1 L'âge**

L'âge est un facteur important dans les tumeurs mammaires canines. Il est rapporté que l'incidence des tumeurs malignes mammaires augmente après l'âge de 6-7 ans (Cohen et al., 1974). Similairement, on retrouve une augmentation de l'incidence et de la mortalité dues au cancer du sein chez la femme avec l'âge de la population.

### **1.1.2 Les hormones**

La démonstration de l'expression des récepteurs aux oestrogènes (ER) et à la progestérone (PgR) dans les tumeurs malignes mammaires suggère que ces hormones jouent un rôle dans la carcinogenèse mammaire canine (MacEwen et al., 1982; Mialot et al., 1982; Sartin et al., 1992; Donnay et al., 1995). Ces

récepteurs sont présents en plus fortes concentrations dans les glandes mammaires normales, les tumeurs bénignes et les tumeurs primaires que dans les tumeurs malignes et les sites de métastases (Mialot et al., 1982; Donnay et al., 1995; Rutteman et al., 1988) qui sont fréquemment négatifs à ces récepteurs. Les hormones stéroïdiennes semblent agir principalement sur les cellules mammaires au début de la carcinogenèse puisque des études ont démontré une diminution de l'expression et des effets stimulants des récepteurs avec le développement de la tumeur mammaire canine (Ruttenman et al., 1988). Les oestrogènes agissent sur les récepteurs ER tels des facteurs de transcription qui dépendent des hormones et qui permettent la régulation de l'expression d'une variété de facteurs de croissance agissant de façon auto- et paracrine dans les lignées cellulaires de tumeurs mammaires primaires (Chalbos et al., 1994). Le cancer du sein chez la femme implique aussi les oestrogènes et la progestérone. Ces hormones influencent le risque de cancer du sein par leurs effets sur la prolifération cellulaire, par leurs dommages sur l'ADN ainsi que par leur promotion de la prolifération cellulaire de la tumeur (Colditz, 1998).

De plus, plusieurs études démontrent que l'ovariectomie chez la chienne diminue drastiquement les risques de développement des tumeurs mammaires (Frye et al., 1967 et Schneider et al., 1969). En effet, Frye et al. (1967) ainsi que Dorn et al. (1968) ont démontré que les femelles ayant subi une ovariohystérectomie avant leur première chaleur ont approximativement 0.5% de risque de développer une tumeur mammaire, alors que les risques augmentent à 8% après la première chaleur et sont de 26% et plus chez des femelles ayant eu

deux chaleurs et plus avant d'être castrées. Cependant, l'ovariectomie pratiquée après le développement d'une tumeur mammaire ne semble pas avoir d'effet sur la progression de la tumeur (Morris et al., 1998). Ces observations démontrent l'importance des hormones stéroïdiennes dans la carcinogenèse mammaire canine.

### **1.1.3 La race**

Le risque de développer des néoplasmes malins varie aussi avec la race du chien. Certaines études ont démontré que les chiens de race pure ont plus de risques de développer une tumeur maligne mammaire que les autres chiens (Dorn et al., 1968; Kurzman et Gilbertson, 1986). C'est ainsi qu'une incidence plus élevée des tumeurs malignes mammaires a été rapportée chez les chiens de chasse (pointer, retrievers, setter anglais, épagneuls), chez les caniches, les Boston terriers, les teckels et les beagles (Moulton, 1990).

### **1.1.4 Les facteurs nutritionnels**

Il semblerait que l'obésité chez l'animal lors de son jeune âge augmente les risques de tumeur mammaire (Sonnenschien et al., 1991; Pérez Alenza et al., 1998). Selon certaines expériences, l'obésité à un an ainsi qu'un an avant le diagnostic d'une tumeur mammaire sont des facteurs qui favorisent le développement des tumeurs mammaires. L'hypothèse proposée est que l'obésité chez les femelles lors du jeune âge pourrait modifier la maturité de l'animal ainsi que son statut hormonal. De plus, l'analyse de l'alimentation des femelles ayant développé une tumeur mammaire permet de faire une corrélation entre une diète

riche en acides gras poly-insaturés provenant de nourriture domestique, comparativement à la prise de nourriture commerciale pauvre en gras, et le risque de développer une tumeur mammaire (Wolfe et al., 1986; Howe, 1992; Schneider et al., 1969). Aussi, une étude sur la diète canine démontre une corrélation positive entre une consommation importante de nourriture riche en viande rouge et pauvre en poulet et les tumeurs malignes mammaires canines (Pérez Alenza et al., 1998). Cette observation est similaire à celles chez l'humain impliquant la consommation de viande rouge, de gras poly-insaturés et le cancer du sein (Hirayama, 1978; Schneider et al., 1969). Finalement, selon d'autres études épidémiologiques, la vitamine A pourrait protéger contre le développement de tumeurs malignes mammaires canines comme lors de cancers du sein chez l'humain (Pérez Alenza et al., 1998; Basu et Sasmal, 1988).

### **1.1.5 Les modifications génétiques**

Des anomalies dans la région chromosomique 1q21-32 sont des évidences génétiques associées avec l'évolution de la néoplasie et appuient l'implication de la COX-2 codée dans cette partie du génome dans la carcinogenèse (Kovacs, 1978). Une étude démontre aussi que la présence de mutations dans le gène p53 dans le développement des tumeurs malignes mammaires chez la chienne est comparable à celles dans les tumeurs du sein humaines (van der Kooy et al. 1996; Muto et al., 2000). Chez l'humain, les mutations somatiques dans la protéine nucléaire p53 sont observées dans approximativement 20-30% des cas de carcinomes primaires du sein (Sullivan et al., 2002). Il est proposé que des

mutations dans le gène p53 pourraient précéder le développement de tumeurs malignes avec un phénotype fortement malin et invasif.

Les gènes BRCA1 et BRCA2 (gène de susceptibilité au cancer du sein 1, 2) sont deux gènes majeurs associées et identifiés au cancer du sein héréditaire. Des mutations germinales spécifiques dans un de ces deux gènes autosomiques supprimeurs de tumeurs augmentent de dix fois le risque de développer un cancer du sein (Wooster et Weber, 2003). Les gènes BRCA1/BRCA2 sont reconnus comme jouant un rôle suppresseur de tumeurs par leur fonction de maintien de la régulation de la réparation de l'ADN, de la transcription et de l'intégrité du génome. Les mutations de BRCA1/BRCA2 pourraient être utilisées comme moyen de sélection pour déterminer les risques de développer un cancer du sein, plus spécifiquement dans les cas héréditaires. Une femme ayant une mutation dans un de ces deux gènes a environ 60-80% de risque de développer un cancer du sein au cours de sa vie (Lee et Boyer, 2001).

## **2. La cascade de l'acide arachidonique**

L'acide arachidonique est un acide gras insaturé de 20 carbones (éicosanoïde). Il est distribué à travers la couche bilipidique de la membrane cytoplasmique des cellules et est normalement estérifié à la position SN-2 des phospholipides. Cette forme estérifiée de l'acide arachidonique représente la composante majeure de la membrane de phospholipides. Suite à un stimulus physiologique ou pathologique (par exemple: l'inflammation), l'enzyme phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub> sécrétée et cPLA<sub>2</sub> cytoplasmique) clive le lien

membranaire arachidonate, formant de l'acide arachidonique libre qui est disponible pour la conversion en lipides bioactifs. L'acide arachidonique est disponible pour trois voies métaboliques: (1) la voie de la lipoxigénase responsable de la production des leukotriènes, (2) la voie de la monooxygénase du cytochrome P-450 qui produit les acides hydroxyeicosatétraénoïques et (3) la voie de la cyclooxygénase responsable de la production des prostanoïdes (Williams et al., 1999). Les étapes de cette dernière voie métabolique sont schématisées dans la Figure 1.

L'enzyme clé de régulation de la biosynthèse des prostaglandines est la prostaglandine H-synthétase (PGHS), aussi appelée la cyclooxygénase (COX) (DeWitt et al., 1993; Funk, 1993). La COX catalyse la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine H<sub>2</sub> lors de deux réactions différentes impliquant deux sites enzymatiques actifs distincts: 1) le site cyclooxygénase et 2) le site peroxydase (DeWitt, 1991). La première étape de la formation de prostaglandines consiste en l'introduction de deux molécules d'oxygène à l'arachidonate par le site actif cyclooxygénase de la COX pour former l'intermédiaire peroxyde bicycliqué, la prostaglandine G<sub>2</sub>. La deuxième étape est effectuée par un deuxième site catalytique, le site peroxydase de la COX. Le résultat de la peroxydation est la réduction de PGG<sub>2</sub> en PGH<sub>2</sub> libre. La PGH<sub>2</sub> peut alors être transformée par différentes synthétases en de nombreux et variés composés essentiels pour l'homéostasie cellulaire comme la prostacycline PGI<sub>2</sub>, les thromboxanes A<sub>2</sub> et B<sub>2</sub> et les prostanoïdes PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub> et PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>.



## 2.1 Les prostanoïdes et leurs fonctions

### 2.1.1 Fonctions physiologiques des prostanoïdes

Von Euler découvrit en 1930 des lipides solubles aux fonctions vasoactives dans les liquides séminaux humains et dans des extraits de vésicules séminales de moutons. Ses recherches à l'époque laissèrent croire que ces lipides provenaient de la prostate, d'où leur nom, prostanoïdes (von Euler, 1936, 1983). Les prostanoïdes comprennent un ensemble de composés (TXA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, PGI<sub>2</sub>) produits rapidement et continuellement après stimulation cellulaire pour agir localement de façon auto- ou paracrine via des récepteurs membranaires. Les métabolites de l'acide arachidonique sont des composés impliqués dans l'équilibre de nombreux processus biologiques tels que la vasodilatation (Kerins et al., 1991), la vasoconstriction (Arita et al., 1989), la cytoprotection, l'inflammation (Herschman, 1994; DuBois et al., 1998), la reproduction (Lim et al., 1997), l'angiogenèse (Gately 2000), l'agrégation des plaquettes (Arita et al., 1989) et les fonctions immunologiques.

Chaque produit dérivé de la COX possède sa propre activité biologique. La PGI<sub>2</sub> et la PGE<sub>2</sub> par exemple, sont vasodilatateurs (Kerins et al., 1991), alors que les thromboxanes (TXA<sub>2</sub> et TXB<sub>2</sub>) sont vasoconstricteurs et servent à l'agrégation des plaquettes (Arita et al., 1989). Les PGF<sub>2</sub>α et PGE<sub>2</sub> sont importantes dans la reproduction (Matsumoto et al., 2001). La PGE<sub>2</sub> et les prostacyclines sont aussi impliquées dans le maintien des fonctions normales gastro-intestinales et hépatiques (Miller, 1983) ainsi que dans la vasodilatation et l'immunologie

(Marnett, 1992). Le type et la quantité de prostanoides formés dépendent de la composition en synthétases dans les différents types cellulaires.

### **2.1.2 Fonctions des prostanoides lors de pathologies**

En plus de leur rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie, les prostanoides jouent un rôle dans la fièvre, la douleur, l'apoptose et l'oncogenèse. Une importante production de PGE<sub>2</sub> pourrait avoir des pouvoirs initiateurs de tumorigenèse. Il est démontré que des concentrations inappropriées de PGs permettent dans plusieurs types cellulaires la stimulation de: 1) la prolifération cellulaire (Bandyopadhyay et al., 1987), 2) la production de facteurs de croissance et d'oncogènes (Coffey et al., 1997), 3) l'induction de la mitogénèse (Nolan et al., 1988), 4) l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire, 5) la résistance à l'apoptose (Tsujii et DuBois 1995; DuBois et Smalley, 1996) et 6) l'angiogenèse (Gately, 2000).

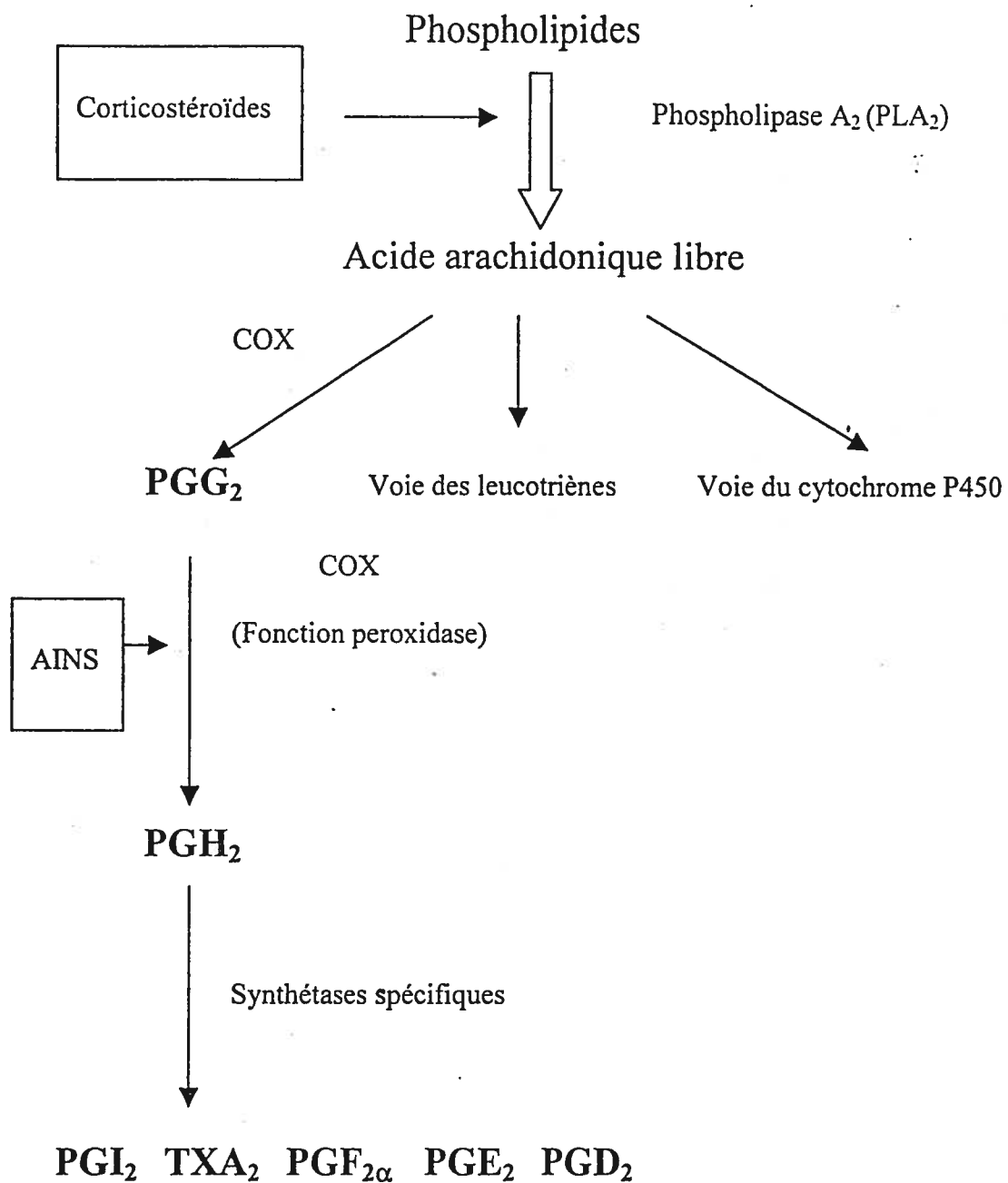


Figure 1 : Voie métabolique de l'acide arachidonique.

Par exemple, une étude sur des hépatocytes de rats démontre que la PGE<sub>2</sub> et la PGI<sub>2</sub> ont comme effet d'augmenter la prolifération cellulaire et la synthèse d'ADN (Kimura et al., 2000). La production incontrôlée de PGE<sub>2</sub>, en plus de favoriser la formation de tumeurs (Bennett et al., 1977), permet aussi une modification de la réponse immunitaire par une inhibition des cellules B et T et une diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK. Ces effets permettent le détournement du système immunitaire de l'hôte et la survie des cellules transformées (Marnett, 1992; Huang et al., 1996).

### **2.1.3 Les récepteurs de la PGE<sub>2</sub>**

Les effets de la PGE<sub>2</sub> sont contrôlés par une famille de quatre récepteurs nommés EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> et EP<sub>4</sub>. Ces récepteurs sont couplés aux protéines G et possèdent sept domaines transmembranaires. Les signaux intracellulaires suite à l'activation de chaque récepteur sont différents. Par exemple, l'activation du récepteur EP<sub>1</sub> permet l'augmentation intracellulaire de Ca<sup>2+</sup>, celle de EP<sub>3</sub> est associée à une diminution d'AMPC alors que EP<sub>2</sub> et EP<sub>4</sub> induisent l'augmentation d'AMPC dans la cellule. Une étude récente sur des cellules de carcinome colorectal indique que la promotion de la croissance et de la motilité cellulaire par la PGE<sub>2</sub> impliquent le récepteur EP<sub>4</sub> (Sheng et al., 2001). Une étude sur les souris APC<sup>Δ716</sup> (ces souris représentent un modèle animal pour la maladie humaine connue sous le nom de polypose adénomateuse familiale) indique que la déficience en récepteur EP<sub>2</sub> permet la diminution de la taille et du nombre des tumeurs intestinales chez l'animal (Sonoshita et al., 2001; Oshima et al., 1996). Le

mécanisme par lequel la  $PGE_2$  interagit avec un récepteur EP en particulier n'est pas clair mais dépend de l'expression, de l'affinité de liaison et de l'activation des récepteurs à la surface cellulaire. Dans plusieurs types cellulaires, les récepteurs EPs ont des effets sur la croissance cellulaire (Cao et Prescott, 2002).

### 3. La COX

La COX fut purifiée en 1976 par Hemler et Lands et, depuis, de nombreuses recherches ont été effectuées sur cette protéine. Les nouvelles technologies ont permis de cloner le gène de la COX en 1988 (DeWitt et Smith, 1988). En 1991, plusieurs laboratoires ont identifié le produit d'un deuxième gène avec une activité COX et ils l'appelèrent la COX-2. Les deux isoformes de la COX ont 63% d'homologie de séquences (Vane et al., 1998) et ont été clonées et caractérisées chez plusieurs espèces (humain, vache, chien, cochon, chèvre, lapin rat et souris) (Hla et Neilson, 1992; Liu et al., 2001; Boutemmine et al., 2002; DeWitt et Smith, 1988; Feng et al., 1993 ; Kennedy et al., 1993).

La COX est un homodimère composé de deux sous-unités d'environ 70,000 daltons et d'un groupe hème. Il s'agit de protéines intégrales de la membrane. Elles sont localisées à la surface luminale du réticulum endoplasmique et dans l'enveloppe nucléaire des cellules humaines (Morita et al., 1995). Tout récemment, un groupe de recherche a rapporté la structure, l'expression et le clonage d'une variante de la COX-1 qu'il ont désigné COX-3 (Chandrasekharan et al., 2002). La COX-3 est produite à partir du gène de la COX-1 mais a conservé l'intron 1 dans son ARNm. L'ARNm de la COX-3 est exprimé dans le cortex

cérébral canin et en plus faibles quantités dans d'autres tissus. Les quantités les plus importantes se retrouvent au niveau du cortex cérébral et du cœur. La protéine COX-3 humaine (65-kDa) est principalement codée par un ARNm de  $\approx$  5.2-kb et semble être spécifique à certains tissus. L'expression de la COX-3 dans des cellules d'insectes démontre que cette isoforme est plus sensible à l'acétaminophène que la COX-1 ou la COX-2.

### 3.1 La COX-1

La COX-1 catalyse la conversion de l'acide arachidonique libre en  $\text{PGH}_2$ . La COX-1 est exprimée continuellement et à un niveau constant indépendamment du cycle cellulaire et dans la plupart des tissus (O'Neill et al., 1993; Kargman et al., 1996). On la retrouve dans l'estomac, les plaquettes, le foie, les poumons, l'intestin, le système nerveux central de l'humain, du rat, du chien et du singe Rhesus (Kargman et al., 1996). La COX-1 est localisée principalement dans le réticulum endoplasmique et dans l'enveloppe nucléaire des cellules endothéliales (Morita et al., 1995).

Le gène de la COX-1 est situé, chez l'humain, dans la région chromosomique 9q32-q33.3 (Vane et al., 1998). Son ADN est d'environ 22 kb et contient 10 exons et 11 introns. La forme active de la protéine contient 576 acides aminés. La COX-1 migre en une seule bande de 72 kDa sur un gel SDS-PAGE, bien que sa masse prédictible par la séquence d'ADNc soit de 65.5 kDa. Cette différence est la conséquence de l'addition d'oligosaccharides lors de la post-transcription (Otto et al., 1993).

Cette isoforme a été initialement caractérisée comme étant responsable d'une faible mais constante synthèse de prostaglandines servant principalement à la cytoprotection et au maintien de l'intégrité de la muqueuse gastrique, à la production de thromboxane  $A_2$  par les plaquettes, à la production de prostaglandines anti-thrombogéniques  $PGI_2$  dans les cellules endothéliales ainsi qu'à la régulation du flot sanguin aux reins par la production de prostaglandine vasoactive  $PGE_2$  (Fosslien, 1998). Les principales caractéristiques de la COX-1 sont résumées et comparées à celles de la COX-2 dans le Tableau I.

### **3.2 La COX-2**

Les travaux indépendants de plusieurs groupes (Simmons et al., 1989, Kujubu et al., 1991, Xie et al., 1991) ont permis la découverte d'un nouvel ADNc de la COX. L'analyse de sa structure cristalline indique que le site actif de la COX-2 est plus large que celui de la COX-1. La plus grande différence entre ces deux isoformes est la régulation de leur expression. La plupart des tissus n'expriment pas la COX-2 continuellement. Les exceptions sont le placenta, la *macula densa* du rein, le cerveau et le foie où la COX-2 possède des fonctions physiologiques fondamentales (Harris et al., 1994; Hirst et al., 1995). Dans la majorité des cas, la COX-2 doit être induite par un stimulus cellulaire pour être exprimée. La région chromosomique où se situe le gène de la COX-2 est le 1q25.2-q25.3 (Vane et al., 1998; Kujubu et al., 1991; DuBois et al., 1994). La taille du gène de la COX-2 est de 8.3 kb et contient 10 exons et 9 introns (Otto et Smith, 1995). L'ARNm de 4.5 kb de la COX-2 est instable comparativement à

celui de la COX-1 (Griswold et Adams, 1996). L'instabilité de l'ARNm de la COX-2 est causée par la présence de 17 copies de la séquence Shaw-Kamen (AUUUA) dans la région 3'-non-transcrite (Kosaka et al., 1994; Shaw et Kamen, 1986). La protéine COX-2 active est composée de 587 acides aminés et apparaît comme un doublet de 72 kDa et 74 kDa sur un gel SDS-PAGE à cause des différences de liaison d'oligosaccharides en position N terminale.

### **3.2.1 La régulation de la COX-2**

L'expression de la COX-2 est normalement régulée au niveau de sa transcription et post-transcription et peut aussi être régulée par le niveau de protéines synthétisées et/ou dégradées. Le promoteur de la COX-2 chez l'humain contient plusieurs sites de liaison pour la régulation de la transcription, incluant l'élément de réponse de l'AMP cyclique (CRE), des sites de liaison potentiels pour Myb, pour le facteur nucléaire interleukine-6 (NK-IL-6), le facteur nucléaire kB (NF-kB) et les facteurs Ets. La région 5' du promoteur de la COX-2 contient une boîte TATA (absente dans le promoteur de la COX-1), ainsi que de nombreux éléments promoteurs agissant en cis, incluant le NF-kB, le NF-IL6, et le CRE (Howe et al., 2001).

Un grand nombre de stimuli peuvent induire rapidement l'expression de la COX-2 et causer par conséquent une augmentation importante de la production de prostanoides, majoritairement de la PGE<sub>2</sub>. Les stimuli pouvant induire la COX-2 incluent les lipopolysaccharides (LPS), l'interleukine-1 (IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ ), le facteur onconécrosant- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), le sérum, le facteur de croissance de l'épiderme (EGF),



le facteur de croissance transformant (TGF- $\beta$ ), la synthétase oxide nitrique inducible (iNOS), les rayons ultraviolets (UVB), l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ), l'acide rétinoïque, le facteur d'activation plaquettaire (PAF), l'endothéline, l'acide arachidonique, ainsi que les oncogènes v-H-ras et v-src, Wnt et HER-2/*neu*. Notons que la COX-1 reste insensible à la majorité de ces stimuli. L'induction de la COX-2 est temporaire, avec un retour à des niveaux normaux entre 24 et 48 heures suivant le traitement (William et al., 1999).

### 3.2.2 Rôles biologiques de la COX-2

La forme inducible de la COX est la principale responsable de la formation de PGs lors de l'inflammation. Les LPS et les cytokines inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  permettent l'induction de la COX-2, qui synthétise alors des PGs pro-inflammatoires (William et al., 1999). L'IL-1 $\alpha$  induit l'expression de la cPLA et mobilise l'acide arachidonique, le substrat de la COX-2. En plus d'être la responsable de la synthèse de PGs associées à la douleur et à la fièvre (Cao, 1996), la COX-2 est aussi impliquée dans le développement du système cardiovasculaire (Loftin et al., 2001), l'arthrite rhumatoïde, la reproduction chez la femelle (ovulation, implantation utérine et invasion du blastocyte), la maladie d'Alzheimer (Breitner, 1996), certaines fonctions immunologiques, la régulation de la croissance cellulaire (Vane et al., 1998; Williams et DuBois, 1996), l'angiogenèse (Tsuji et al., 1998), l'apoptose (Tsuji et DuBois 1995; Lu et al., 1995) et la prolifération et la croissance des cellules normales et cancéreuses (Howe et al., 2001).

#### 4. Expression de la COX dans les tumeurs

En 1977, Hong et al. ont découvert que l'activité de la COX-1 était augmentée dans les cellules transformées de souris BALB/3T3 (Hong et al., 1977). La découverte, 12 ans plus tard, de la COX-2 fournit un mécanisme expliquant le phénomène d'augmentation importante et soudaine de la concentration des PGs dans les cellules transformées étudiées (Simmons et al., 1989; Rolland et al., 1980). Effectivement, les recherches démontrent que la COX-2 est induite dans un grand pourcentage de tumeurs (Prescott et Fitzpatrick, 2000; Soslow et al. 2000). La surexpression de la COX-2 dans les néoplasmes humains a été démontrée dans les cancers du côlon (Eberhart et al., 1994; Sano et al., 1995), gastriques (Ristimäki et al., 1997; Uefuji et al., 1998), pancréatiques (Tucker et al., 1999), prostatiques (Gupta et al., 2000), pulmonaires (Wolff et al., 1998), du sein (Parrett et al., 1997; Hwang et al., 1998), du cou et de la tête (Jung et al., 1985), de l'œsophage (Wilson et al., 1998), de la peau (Buckman et al., 1998) et du foie (Mohammed et al., 2000).

Chez l'espèce canine, la surexpression de la COX-2 a été démontrée dans le cancer de la prostate (Tremblay et al., 1999), les carcinomes spinocellulaires (Pestilli de Almeida et al., 2001), les carcinomes rénaux (Khan et al., 2001), de la vessie (Khan et al., 2000) et les tumeurs malignes mammaires (Doré et al., 2003) ainsi qu'intestinales (McEntee et al., 2002). En ce qui concerne la COX-1, les études démontrent qu'elle est exprimée majoritairement dans les tissus normaux et qu'elle est peu impliquée dans l'inflammation et la carcinogenèse (Parrett et al., 1999; Chulada et al., 2000). Toutefois, une étude immunohistochimique de

spécimens de tumeurs malignes mammaires humaines réalisée par Hwang et al. (1998) démontre une plus grande concentration de la COX-1 dans les tumeurs comparativement aux tissus sains correspondants. Dans ces tissus, la COX-1 était immunolocalisée dans les cellules stromales adjacentes aux cellules cancéreuses.

Tableau I : Sommaire des différences entre les 2 isoformes de la COX

	<b>COX-1</b>	<b>COX-2</b>
<b>Expression</b>	Constitutive	Inductible
<b>Induction</b>	Peut augmenter de 2 à 4 fois	Peut augmenter de 10 à 80 fois
<b>Protéine</b>	Bande simple de 69 kDa	Doublet à 70 et 72 kDa
<b>Région Ct</b>	18 cassettes d'acides aminés absentes	18 cassettes d'acides aminés
<b>Gène (kb)</b>	22	8.3
<b>Chromosome humain</b>	9	1
<b>Taille de l'ARNm (kb)</b>	2.8	4.0 - 4.5 * plusieurs séquences Shaw-Kamen (AUUUA)
<b>Acides aminés</b>	602	604
<b>Localisation</b>	Réticulum endoplasmique	RE, enveloppe nucléaire
<b>Lieu d'expression</b>	Plaquettes, estomac, foie, côlon, la majorité des tissus	Cerveau, reins, macrophages activés, cellules épithéliales malignes, cellules et tissus où il y a stimulation par des cytokines, des facteurs de croissance et des promoteurs de tumeurs.

## 4.1 La COX-2 et la carcinogénèse

### 4.1.1 La COX-2 et l'angiogénèse

L'angiogénèse est un processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés; il s'agit d'un élément clé de la tumorigénèse puisque la néovascularisation est essentielle pour la croissance des tumeurs de plus de 2-3 mm de grosseur. Les évidences de l'implication de la COX-2 dans l'angiogénèse proviennent de trois types d'expériences. Premièrement, des études *in vitro* démontrent que des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 diminuent la formation de tubules endothéliaux (Tsujii et al., 1998), alors que des études *in vivo* avec des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 démontrent une réduction de l'angiogénèse dans plusieurs modèles expérimentaux (Sawaoka et al., 1999; Masferrer et al., 2000). Par exemple, l'équipe de Masferrer (2000) a démontré la présence de la COX-2 dans les vaisseaux sanguins néoformés de patients. Cette découverte indique que la COX-2 joue un rôle dans l'angiogénèse et suggère que des inhibiteurs pourraient affecter la croissance des tumeurs en inhibant la néovascularisation essentielle à la survie de la tumeur. L'équipe a utilisé deux modèles animaux (carcinome des poumons Lewis et carcinome du côlon HT-29 humain) pour évaluer l'effet antitumorigénique du célécoxib (un inhibiteur sélectif de la COX-2). Les deux modèles développent de nouveaux vaisseaux sanguins lorsque la tumeur atteint un volume plus grand que 1.5 cm<sup>3</sup>. Le célécoxib inhiba de façon dose-dépendante la croissance et le nombre de métastases. Deuxièmement, la surexpression de la COX-2 et la forte production de PGE<sub>2</sub> favorisent

l'angiogénèse. Elles sont responsables de l'augmentation de l'expression de facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le bFGF, le TGF-1, le PDGF, l'endothéline et le VEGF (Tsuji et al., 1998; Gately, 2000). Les mécanismes moléculaires de la production de ces facteurs pro-angiogéniques par la COX-2 ne sont pas clairement résolus.

#### **4.1.2 La COX-2 et le système immunitaire**

La COX-2 permet la synthèse de PGs et la surexpression de la COX-2 augmente considérablement le niveau de PGs dans plusieurs types de cancers. Il est démontré que la PGE<sub>2</sub> produite dans plusieurs types de cancers inhibe la prolifération cellulaire des cellules B et T du système immunitaire et la synthèse des cytokines du système immunitaire en plus de diminuer l'activité cytotoxique des cellules NK (Marnett, 1992; Gately, 2000). Cet effet antiprolifératif contribue à la suppression du système immunitaire associée aux PGs. La PGE<sub>2</sub> inhibe la production de TNF- $\alpha$  et induit l'IL-10, qui ont des effets immunosuppresseurs (Huang et al., 1996). Les PGs produites suite à la surexpression de la COX-2 permettent ainsi aux cellules transformées de déjouer la surveillance immunitaire.

### 4.1.3 La COX-2 et l'apoptose

Il a été démontré que la surexpression de la COX-2 induit une résistance à l'apoptose. Ceci a comme effet de prolonger la survie des cellules et de favoriser l'accumulation de cellules ayant subi des changements génétiques. L'implication de la COX-2 dans l'inhibition de l'apoptose s'explique principalement par deux mécanismes différents. Premièrement, la présence de la forte activité enzymatique de la COX-2 dans les cellules cause une diminution intracellulaire de l'acide arachidonique qui est normalement nécessaire à l'activation de l'apoptose via la voie des caspases (Scorrano et al., 2001). Deuxièmement, la surexpression de la COX-2 permet une forte augmentation de la concentration de PGE<sub>2</sub>. La PGE<sub>2</sub> permet l'inhibition de la mort cellulaire par la réduction du niveau des protéines pro-apoptiques Bax et Bcl-x et l'induction du proto-oncogène Bcl-2 (Battu et al., 1998; Subbaramaiah et al., 1997). Une étude avec des souris transgéniques surexprimant la COX-2 dans les glandes mammaires suggère que la diminution de l'apoptose des cellules épithéliales mammaires suite à la surexpression de la COX-2 contribue à la tumorigenèse mammaire (Liu et al., 2001). Les effets anti-apoptotiques de la surexpression de la COX-2 peuvent être contrés par le traitement des cellules néoplasiques avec des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 (Dannenberg et Zakim, 1999).

#### 4.1.4 La COX-2 et la formation d'agents mutagènes

En plus de permettre une importante augmentation de la concentration de PGs impliquées dans la carcinogenèse, l'induction de la COX-2 permet aussi la production d'agents mutagènes. Le malondialdéhyde (MDA) est l'un de ces éléments. Il est produit par l'isomérisation enzymatique ou non de la PGH<sub>2</sub>. Ce composé contribue à la carcinogenèse en se liant aux désoxynucléotides et en induisant des substitutions de paires de bases ainsi que des déphasages d'ADN (Marnett, 1992). En plus de la production de MDA, la COX peut aussi conduire à la formation d'autres agents impliqués dans la carcinogenèse. En effet, la première étape de la formation des prostanoïdes par la COX-2 est possible grâce à sa fonction oxygénase et les intermédiaires produits par cette première étape sont très réactifs avec l'ADN cellulaire, facilitant ainsi l'initiation de la tumorigenèse. La deuxième étape de production de prostanoïdes se fait par la fonction réductase de la COX; la réduction de PGH<sub>2</sub> nécessite un cofacteur qui sera co-oxydé. L'oxydation d'un composé autre que le cofacteur peut générer des produits contribuant à la carcinogenèse. Par exemple, la réduction de PGH<sub>2</sub> peut oxyder l'estrogène en un composé carcinogène (Prescott et Fitzpatrick, 2000).

#### 4.1.5 Modèles génétiques de l'implication de la COX-2 dans la carcinogenèse

Plusieurs modèles génétiques illustrent la relation entre la COX-2 et la carcinogenèse. La première évidence génétique liant la COX-2 et la tumorigenèse provient d'études faites sur des souris APC<sup>Δ716</sup> (Oshima et al., 1996). Les auteurs



ont muté le gène de la COX-2 chez ces souris et ont noté une réduction significative de la taille et du nombre de polypes ainsi qu'une réduction de l'incidence du néoplasme chez les souris n'exprimant pas la COX-2. La même équipe démontra aussi l'implication génique de la COX-2 dans la carcinogenèse et indiqua que des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 pourraient être utilisés comme agents thérapeutiques pour les cancers. Ils démontrèrent une diminution de 60% de la formation de polypes colorectaux lorsque la COX-2 est inhibée sélectivement.

D'autres évidences génétiques reliant la COX-2 et la tumorigenèse ont été démontrées par des études avec des souris transgéniques surexprimant la COX-2 dans certains tissus spécifiquement ciblés. Par exemple, des études démontrent que la surexpression de la COX-2 est suffisante pour induire la tumorigenèse spécifiquement où elle est induite, soit la peau et la glande mammaire (Neufang et al., 2001, Liu et al., 2001). Ces études démontrent que la surexpression de la COX-2 est suffisante pour induire la formation de tumeurs malignes mammaires dans plus de 85% des souris multipares. La synthèse de PGE<sub>2</sub>, de 6-ceto-PGF<sub>1</sub>-alpha, de PGD<sub>2</sub>, et de PGF<sub>2</sub>, était augmentée parallèlement à l'expression de l'ARNm de la COX-2 dans ces souris.

#### **4.2 La COX-2 et les tumeurs malignes mammaires**

Les études de la surexpression de la COX-2 dans le cancer du sein chez l'humain donnent des résultats divergents. L'implication de la COX-2 dans les cancers du sein a d'abord été suggérée suite à l'observation de hauts niveaux de

synthèse de PGs, majoritairement la PGE<sub>2</sub>, par les tissus mammaires. La production de PGs est démontrée dans plusieurs tumeurs dont le cancer du sein (Tan et al., 1974; Bennett et al., 1977). Par la suite, de nombreuses études ont effectivement démontré la surexpression de l'ARNm et de la protéine COX-2 dans certains cas de cancers du sein chez l'humain (Parrett et al., 1997; Hwang et al., 1998; Soslow et al., 2000; Ristimäki et al., 2002; Half et al., 2002) ainsi que dans des modèles animaux de tumorigenèse mammaire induite par des agents carcinogènes, des virus et des oncogènes (Xie et Herschman, 1995; Sheng et al., 1998; Subbaramaiah et al., 1996). Mais les données sont limitées et divergentes à propos de la fréquence de l'expression de la COX-2 dans les cancers du sein naturels.

Une étude démontre que la transformation de deux lignées cellulaires épithéliales mammaires de souris *in vitro* implique l'induction de la transcription de la COX-2 et l'augmentation de la PGE<sub>2</sub>. Les lignées cellulaires transformées à l'aide de virus (R111/Pr1) ou avec l'oncogène *ras* (C57/MG) sont hautement tumorigéniques chez la souris et produisent des quantités importantes de PGE<sub>2</sub> (Subbaramaiah et al., 1996). Une étude publiée par Parrett et al. (1997) sur des tumeurs du sein analysées par RT-PCR démontra la présence de la COX-2 dans la tumorigenèse mammaire. Sur les treize cas analysés, tous exprimaient la COX-2. De plus, une étude immunohistochimique rapporte que 56% des cancers invasifs du sein expriment la protéine COX-2 avec des niveaux variant de forts à modérés (Soslow et al., 2000). De même, l'étude de Chan et al. (1999) a démontré la surexpression de COX-2 dans toutes (10/10) les carcinomes spinocellulaires.

Récemment, une étude intéressante sur des souris transgéniques démontre pour la première fois que la surexpression de la COX-2 est en elle-même suffisante pour induire des tumeurs malignes mammaires (Liu et al., 2001). Les auteurs ont utilisé des souris transgéniques qui surexpriment le gène humain de la COX-2. L'ARNm et la protéine de la COX-2 étaient exprimés dans ces souris transgéniques et étaient fortement induits lors de la gestation et de la lactation. L'analyse de la glande mammaire chez les femelles multipares démontra une diminution de l'apoptose des cellules mammaires épithéliales ainsi que de l'hyperplasie, de la dysplasie ainsi que la transformation en tumeurs métastatiques.

Par la suite, d'autres études ont démontré un très haut niveau de COX-2 dans 37.4% des carcinomes étudiés par immunohistochimie sur une série de 1567 cancers du sein invasifs (Ristimäki et al., 2002). Ces hauts niveaux d'expression étaient associés à une taille importante de la tumeur, à un statut négatif aux récepteurs hormonaux, à un haut niveau de prolifération cellulaire et à un fort niveau d'expression de la protéine p53. Parallèlement, chez l'espèce canine, une étude immunohistochimique récente a démontré que 24% des adénomes mammaires canins ont une faible expression de COX-2 alors que 56% des tumeurs malignes (carcinomes) ont une faible à forte expression de la COX-2 (Doré et al., 2003).

Des études intéressantes démontrent une expression simultanée de la COX-2 et de la protéine HER-2 (aussi appelée *c-erbB-2* et *neu*) dans la tumorigenèse mammaire humaine. La HER-2 est une protéine de 185 kDa; il s'agit d'un récepteur transmembranaire de la famille des facteurs de croissance épidermique

avec une activité tyrosine kinase (Ullrich et Schlessinger, 1990). La surexpression de la HER-2 active la voie Ras et augmente la mitose (Reese et Slamon, 1997). L'amplification et/ou la surexpression de la HER-2 est présente dans 20-30% des cancers du sein chez l'humain et l'augmentation de son expression est associée avec un mauvais pronostic chez les patientes (Slamon et al., 1989). L'étude de Howe et al. (2001) a établi une corrélation entre une forte expression de la COX-2 et de la HER-2. L'analyse immunohistochimique de 15 cas de cancer du sein en terme d'expression de COX-2 et de HER-2 a permis de démontrer que 14 cas/15 exprimaient simultanément ces deux protéines. La même équipe de recherche a aussi testé l'effet d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2 sur des souris qui surexprimaient la HER-2 dans les glandes mammaires (souris MMTV/*neu*). Après avoir démontré que ce modèle de souris surexprime simultanément la HER-2 et la COX-2, elle utilisa ce modèle pour observer le traitement des souris avec du célécoxib, un inhibiteur sélectif de la COX-2. L'étude révéla une diminution de l'incidence des tumeurs chez les souris traitées avec cet inhibiteur (Howe et al., 2001). Une autre étude démontre que la surexpression de HER-2 stimule la transcription de la COX-2. L'analyse protéique a révélé que la transformation cellulaire causée par HER-2 est associée avec l'augmentation de la transcription de la COX-2. De plus, cette étude a démontré que la stimulation de la transcription de la COX-2 est possible grâce à la voie de l'oncogène Ras dans les cellules épithéliales mammaires humaines (Subbaramaiah et al., 2002). Finalement, une étude immunohistochimique visant à déterminer l'association de niveaux élevés de COX-2 avec des paramètres clinicopathologiques a révélé que 50.4% des

tumeurs immunopositives à la COX-2 étaient simultanément positives à l'amplification de la HER-2 (Ristamäki et al., 2002).

Par contre, une des premières études sur l'expression de la COX-2 dans les cancers du sein a montré une forte expression de la COX-2 dans seulement 5% des échantillons analysés (2/44) par immunobuvardage. Dans cette étude, la COX-1 était présente dans 30 des 44 cancers du sein étudiés et n'était pas localisée dans les cellules tumorales mais bien dans les cellules stromales adjacentes (Hwang et al., 1998). Une étude suggère que la surexpression de la COX-2 permet le relâchement de substances qui pourraient induire l'expression de la COX-1 dans les cellules adjacentes (Fosslien, 2000).

## **5. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)**

### **5.1 Effet analgésique, anti-inflammatoire, antipyrétique et anti thrombotique des AINS**

L'observation que la COX est la cible pharmacologique des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) à été rapportée initialement par Vane et al. (1971). Ceux-ci démontraient que l'acide acétylsalicylique (aspirine) inhibait la production de PGs impliquées dans l'inflammation en bloquant l'activité enzymatique de la cyclooxygénase. Les AINS sont depuis utilisés pour supprimer l'inflammation, diminuer la douleur, la fièvre et prévenir les thromboses. Les AINSs traditionnels comme l'aspirine, l'ibuprofène et l'indométacine inhibent les deux isoformes de la COX en les modifiant de façon covalente ou en créant une compétition de liaison avec le substrat au site actif. De légères différences aux

sites actifs des deux isoformes expliquent les effets différents des inhibiteurs sur l'activité enzymatique des deux enzymes (Loll et al., 1995). Par exemple, l'aspirine bloque l'activité enzymatique oxydase par l'acétylation de la Ser-530 chez la COX-1, et de la Ser-516 chez la COX-2 (Wennogle et al., 1995).

Les nouveaux AINS sont des inhibiteurs spécifiques de la COX-2 et ciblent l'excès de PGs au site inflammatoire en respectant les PGs produites par la COX-1 par les tissus sains. L'utilisation d'AINS non-spécifiques est associée à des effets indésirables créés par l'inhibition de la COX-1. En effet, ils inhibent la synthèse des PGs impliquées dans l'homéostasie cellulaire et qui sont des produits majoritairement synthétisés par la COX-1. Les AINS non-spécifiques perturbent l'homéostasie corporelle par l'inhibition de l'agrégation des plaquettes (Schafer, 1995), la réduction des PGs cytoprotectives comme la PGI<sub>2</sub> ou la PGE<sub>2</sub>, par des effets néfastes aux reins ainsi que par des ulcérations et perforations du tractus gastro intestinal (Miller, 1983).

## **5.2 Effet anticancer des AINS**

En plus de leur rôle anti-inflammatoire et analgésique, plusieurs AINS sont reconnus depuis le début des années 90 comme étant des agents pouvant prévenir certaines formes de cancer. Plusieurs études épidémiologiques démontrent que la prise quotidienne d'AINS diminue l'incidence de cancer du côlon, du sein et des poumons (Giovannucci et al., 1994; Giovannucci et al., 1995; Harris et al., 1996). Des modèles expérimentaux démontrent que les AINS protègent aussi du cancer

de l'œsophage, mammaire, oral et du côlon (Paganini-Hill et al., 1989 ; Prescott et Fitzpatrick, 2000; Boolbol et al., 1996). Par exemple, une réduction de 40-50% du risque relatif de mortalité par le cancer du côlon a été rapportée chez les personnes utilisant régulièrement de l'aspirine ou d'autres AINS similaires (Giovannucci et al., 1994).

Une association entre la prise d'AINS et la diminution de l'incidence du cancer du sein a été démontrée dans une étude sur l'incidence du cancer du sein chez 4867 femmes qui utilisaient l'indométacine (Friedman et Ury, 1980). Une autre étude a aussi conclu que le risque relatif du cancer du sein était réduit de 66% chez les femmes utilisant des AINS trois fois par semaine durant au moins un an (Harris et al., 1996). De plus, une étude démontre que la prise quotidienne d'aspirine ou d'ibuprofène pendant cinq années par 32,505 femmes en Ohio a causé une diminution de 40-50% des cancers du sein (Sharpe et al., 2000).

Contrairement à ces études, certaines études ne démontrent aucune relation entre la prise d'AINS et la diminution de l'incidence du cancer du sein (Paganini-Hill et al., 1989; Thun et al., 1991; Egan et al., 1996). La raison de ces divergences dans les résultats n'est pas claire. Une possibilité est que la proportion des cancers du sein surexprimant la COX-2 n'est pas aussi grande que celle de cancers du côlon et que l'effet des AINS est limité aux cancers du sein qui surexpriment la COX-2.

### 5.2.1 Les AINS sélectifs à la COX-2

Les caractéristiques analgésiques, anti-inflammatoires ainsi que la nouvelle propriété anticancer de plusieurs AINS sont reliées selon de nombreuses études à leur capacité d'inhiber particulièrement l'activité enzymatique de la COX-2 (Simmons et al., 1999; Marnett, 1992; Taketo, 1998; DuBois et al., 1998). La COX-2 est effectivement devenue une cible thérapeutique pour la prévention et/ou la thérapie de nombreuses tumeurs solides telle que le cancer du sein (Hwang et al., 1998). La sélectivité de différents AINS est indiquée dans le Tableau II.

Le rofecoxib (Vioxx<sup>®</sup>) et le célécoxib (Celebrex<sup>®</sup>) sont de nouveaux AINS arrivés sur le marché canadien à la fin des années 1990. Ces molécules sont sélectives à la COX-2 et sont utilisées pour leur fort pouvoir analgésique et anti-inflammatoire, par exemple ne causent pas de complications gastro-intestinales avec la prise du médicament comparativement aux AINS traditionnels. Les problèmes reliés à la prise de AINS classique au niveau du tube digestif, sont normalement reliés à l'inhibition de la COX-1, l'isoforme exprimée continuellement dans la majorité des tissus. Le rofecoxib (4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone) inhibe la COX-2 80 fois plus que la COX-1 et est, comparativement au célécoxib, plus spécifique pour la COX-2 (Prasit et al., 1999). En plus de ces qualités, les recherches ont permis d'associer un potentiel anti-cancer à ces nouveaux AINS hautement sélectifs à la COX-2. Des études sur des souris chez qui des tumeurs malignes mammaires ont été induites chimiquement ont démontré un effet antitumoral supérieur du célécoxib (COX-2-spécifique) comparativement à l'ibuprofène (non-spécifique) sur la



tumorigenèse mammaire (Harris et al., 2000). La prise de célécoxib diminue l'incidence, le nombre et le volume des tumeurs malignes mammaires par 68%, 86%, et 81%, respectivement selon cette étude.

D'autres études avec des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 démontrent aussi une importante diminution de l'incidence et de la progression des tumeurs autant chez les modèles animaux que lors de traitements de patients atteints de cancers sans toutefois le profil toxique des AINS traditionnels (Subbaramaiah et al., 1997; Gupta et DuBois, 2000). Par exemple, le NS-398, à une concentration de 100  $\mu$ M, permet l'arrêt du cycle cellulaire et l'arrêt de la croissance de la lignée cellulaire néoplasique SCCHN (épithélioma spinocellulaire du cou et de la tête). Suite à cette observation, le groupe de recherche suggèra que la COX-2 est impliquée dans la carcinogenèse et que les inhibiteurs sélectifs à la COX-2 pourraient être des composés intéressants pour le traitement et la prévention des cancers (Lee et al., 2002). Des études effectuées sur des carcinomes des cellules transitionnelles de la vessie démontrent que le piroxicam, un second inhibiteur sélectif à la COX-2, réduit le volume de la tumeur dans 12 cas sur 18. Cette diminution de volume est associée avec l'induction de l'apoptose et la réduction dans l'urine de la concentration en bFGF (Mohammed et al., 2002). Finalement, au cours des dernières années, des observations intéressantes ont démontré un potentiel chimiopréventif de certains composés naturels phytochimiques et suscitent, depuis, beaucoup d'intérêts. Plusieurs composés comme la sulforaphane (du brocoli) et son analogue, la sulforamate, ainsi que le resvératrol (dérivés des raisins, des arachides et de d'autres produits), sont présentement testés à des

niveaux précliniques et même cliniques pour la prévention de certaines formes de cancers (Park et Pezzuto, 2002). Le resvératrol (*trans*-3,4',5-trihydroxystilbene; un inhibiteur de la COX-1 et de la COX-2) présent dans le vin rouge a été testé pour son potentiel chimiopréventif sur des tumeurs malignes mammaires induits chimiquement à l'aide de 7,12-diméthylbenz(*a*)anthracène (DMBA) sur des rates. L'administration de resvératrol (10 ppm) n'a aucun effet sur la prise de poids et sur le volume des tumeurs mais produit une forte réduction de l'incidence (45%;  $P < 0.05$ ) et de la multiplicité (55%;  $P < 0.001$ ) des tumeurs ainsi qu'une augmentation de la période de développement des tumeurs induites par le DMBA (Banerjee et al., 2002). Une autre étude a démontré l'effet du resvératrol sur des cellules épithéliales mammaires et orales humaines où il y a eu stimulation de l'expression de la COX-2 par le PMA. Normalement, un traitement au PMA induit une remarquable induction de l'expression de la COX-2 et de la PGE<sub>2</sub>, mais lorsque les cellules ont été traitées simultanément avec le resvératrol et le PMA, l'induction de l'ARNm et de la protéine COX-2 causée par le PMA n'a pas été observée (Subbaramaiah et al., 1998).

Tableau II : Sélectivité de différents AINS pour la COX-1 et la COX-2.

AINS non-sélectifs	AINS sélectifs à la COX-2	AINS hautement sélectifs à la COX-2
Aspirine®  Diclofenac (Voltaren®)  Ibuprofène (Advil®, Motrin®)  Indométacine  Resvératrol (Polyphénol, trihydroxystilbène)	Etodolac (Lodine®)  Meloxicam (Mobic®, Métacam®)  Nimesulide	Célécoxib (Celebrex®)  Rofecoxib (Vioxx®)  Parecoxib  NS-398

## Objectif

L'implication de la COX-2 dans les tumeurs malignes mammaires canines a été peu étudiée comparativement dans les cas de cancer du sein chez la femme. L'objectif de cette étude était donc de comparer par des essais *in vitro* le niveau d'expression de la COX-2 par des cellules épithéliales mammaires canines normales et néoplasiques.

## Article

### Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumor-Derived Cells

Brunelle M., Sartin E.A., Wolfe L.G., Sirois J. et Doré M.

## Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumor-Derived Cells

Mélanie Brunelle\*, Eva A. Sartin‡,

Lauren G. Wolfe‡, 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 ‡Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine,  
Auburn University, Alabama 36849

§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:

████████████████████

## ABSTRACT

Mammary malignant tumor is the most common cancer in female dogs. Induction of cyclooxygenase-2 (COX-2), a key enzyme in prostaglandins (PGs) biosynthesis, has been demonstrated in various cancers in humans and dogs, including mammary cancer. The objective of this study was to characterize COX-2 expression and regulation in canine mammary epithelial cells *in vitro*. Several cell lines derived from normal and neoplastic canine mammary glands were cultured in the absence or presence of agonist, and immunoblots, immunocytochemistry and radioimmunoassays were used to study COX-2 expression and PGs production. Results showed that the neoplastic cell line CMT12 constitutively overexpress COX-2 protein while the other cell lines expressed low to moderate basal levels of COX-2 protein. In all cell lines studied, COX-2 protein decreased in a time-dependent manner with serum starvation, and PMA stimulation induced a time-dependent increase in COX-2 protein, with the highest induction observed in CMT12. PGE<sub>2</sub> production was higher in CMT12 compared to other cell lines. In the COX-2 overexpressing cell line, CMT12, proliferation and PGE<sub>2</sub> production could be inhibited by specific and non-specific COX-2 inhibitors. These results indicate that some neoplastic canine mammary cell lines constitutively overexpress COX-2, and that COX-2 inhibition decreases cell proliferation, suggesting a role for COX-2 in canine mammary oncogenesis.

Keywords: Dog, Cyclooxygenase, Prostaglandins, Mammary tumors.

## INTRODUCTION

Mammary malignant tumor is the most common neoplasms in female dogs (Brodey et al. 1983; Bostock 1986; Moulton 1990). Both benign and malignant tumors are frequently diagnosed, and malignant neoplasms represent approximately 50% of all mammary tumors (Moulton 2002; Gilbertson et al. 1983; Hamilton 1974). Malignant tumors can recur following surgical excision or can metastasize to distant organs such as lymph nodes, lung, bone, brain and liver (Owen 1979). Canine mammary tumors are age-dependent neoplasms, with a mean age at onset of 6 to 7 years (Cohen 1974). All breeds of dogs can be affected, but certain breeds (sporting breeds for example) appear to show a higher prevalence (Moulton 1990). Canine mammary tumors are hormone-dependent neoplasms, and early ovariectomy (i.e. before the first estrous cycle) has a protective effect (Schneider 1969). A recent study reported that low levels of oestrogens receptors (ER) in canine primary malignant tumors are significantly associated with the occurrence of metastases (Nieto 2000). Also, progestin-induced biosynthesis of growth hormone has recently been proposed as one of the mechanisms that could promote mammary tumorigenesis in dogs (Van Garderen 1997).

The first rate-limiting step in the synthesis of all prostaglandins is controlled by the enzyme prostaglandin G/H synthase, also known as cyclooxygenase (COX) (Smith 1992; Funk 1993). COX mediates the conversion of arachidonic acid into  $\text{PGH}_2$ , a common precursor for the synthesis of all prostanoids. Two isoforms of COX (COX-1 and COX-2) have been identified (Smith et al. 1996). COX-1 is



present in a wide variety of tissues and is often referred to as the constitutive form. In contrast, COX-2 is generally undetectable in most tissues but can be induced by different agonists, and is referred to as the inducible form. Overexpression of COX-2 has been reported in several types of cancer in humans, and selective targeting of COX-2 appears as a promising new therapeutic avenue for the prevention and treatment of cancer (Subbaramaiah et Dannenberg 2003).

Epidemiological studies have reported that the regular use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) may protect against breast cancer (Schreinemachers et Everson 1994; Harris et al. 1996; Sharpe et al. 2000). The role of COX-2 in mammary tumorigenesis was recently highlighted by a study demonstrating that COX-2 overexpression alone is sufficient to cause breast tumor formation (Liu et al. 2001). Several reports have also demonstrated that COX-2 is overexpressed in breast cancer (Parrett et al. 1997; Soslow et al. 2000; Masferrer et al. 2000; Ristimaki et al. 2002; Half et al. 2002). In dogs, COX-2 overexpression has so far been reported in renal, urinary, prostatic, intestinal and mammary tumors as well as in squamous cell carcinomas (Khan KH et al. 2000, 2001; Tremblay et al. 1999; McEntee 2002; Pestili de Almeida et al. 2002; Doré et al. 2003). In a recently published study of 84 cases of canine mammary carcinomas, we found that more than half of the carcinomas displayed weak to strong COX-2 staining (Doré et al. 2003). These results suggest that COX-2 expression could play a role in canine mammary oncogenesis. The objective of the present study was to characterize an *in vitro* model of canine neoplastic

mammary cell lines to investigate the expression, regulation and possible role of COX-2 overexpression in canine mammary malignant tumor.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), dimethyl sulfoxide (DMSO), indomethacin and resveratrol were obtained from Sigma Aldrich Canada (Oakville, On, Canada); Hybond polyvinylidene difluoride membranes 0.45 $\mu$ 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 GmbH; NS-398 was purchased from Cayman Chemical CO (Ann Arbor, USA); Dulbecco' Modified Eagles's Medium (DMEM), Leibovitz (L-15), Hepes tampon, Phosphate buffered saline (PBS), Hank's balanced Salt Solution (HBSS), TRIzol were purchased from Gibco BRL Life Technologie, Inc. (Grand Island, NY), EGF was obtained from Peptotec Canada, Inc. (Ottawa, On, Ca), Bio-Rad Protein Assay and electrophoretic reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). Quik Hyb solution was from Stratagene (Cedar Creek, TX) and One step RT-PCR kit system was purchased from Qiagen Inc. ( Mississauga, On, Ca).

## Cell Culture

The cell lines CF35, CF33 and CF41 were obtained from ATCC (Mannassas, Virginia). They were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and penicillin G (100 U/ml)-streptomycin (100 µg/ml). The cell lines CMT12, CMT9 and CMT28 were established from dogs with spontaneous mammary carcinomas (Wolfe et al. 1986). They were cultured in L-15 medium supplemented with 10% fetal calf serum and penicillin G (100 U/ml)-streptomycin (100 µg/ml). Cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, 95% air, and passaged by exposure to trypsin/EDTA (0.05/0,02% w/v) in Dulbecco's phosphate buffered saline (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 (5 sec/cycle; 4 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 13,000 x g for 25 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 sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and electrophoretically

transferred to Hybond polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. 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 1 h 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 1 h 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.

#### RNA Extraction and Semi-quantitative RT-PCR/Southern Blotting.

Total RNA was extracted using TRIzol (Life Technologies). The One step RT-PCR kit (Qiagen) was used for semi-quantitative analysis of COX-2 and GAPDH mRNA levels. Reactions were performed as directed by the manufacturer, using sense (5'-CTGAAGTTTGACCCAGAGGTGC-3') and anti-sense (5'-GCTAGGCTTCCAGTAGTCAGG-3') primers specific for canine COX-2, and sense (5'-TCTGCTCCTTCTGCTGATGCC-3') and anti-sense (5'-GACTGTTGAAGTCACAGGAGACC-3') primers for canine GAPDH. Each reaction was performed using 100 ng of total RNA, and RT reaction were performed at 50°C for 30 min, 95°C for 15 min, and cycling condition were 94°C during 30 seconds, 58°C for 1 min, and 72°C during 2 min. The number of cycles

used was optimized for each gene to fall within the linear range of PCR amplification, and were 18 and 17 cycles for COX-2 and GAPDH, respectively. Following PCR amplification, samples were electrophoresed on 2% TAE-agarose gels, transferred to nylon membranes, and hybridized with corresponding radiolabeled COX-2 and GAPDH cDNA fragments using QuikHyb hybridization solution (Stratagene).

#### Prostaglandin E<sub>2</sub> Radioimmunoassay

Concentrations of PGE<sub>2</sub> 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 PGE<sub>1</sub>, PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , and 6-keto PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  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, 5% acetic acid, and immunocytochemical staining for COX-2 (MF243) or COX-1 (8223) 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 (Vistica et al. 1991). For this assay, cells were seeded in 96-well plates at a density of 30,000 cells/well for CMT12 and 15,000 cell/well for CF35. 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 4 h at 37°C. Spectrophotometric absorbance of the samples was measured with a microtiter plate reader at a wavelength of 450 nm.

## RESULTS

*Characterization of COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> synthesis in canine mammary cell lines.* Six different canine mammary cell lines were initially characterized. Five of them (CF33, CF41, CMT9, CMT12 and CMT28) are derived from canine mammary tumors, and one cell line (CF35) is reportedly from normal canine mammary tissue. Expression of COX-2 in these cell lines cultured in complete medium was determined by immunoblot analysis using a selective anti-COX-2 antibody, and results showed that basal levels of COX-2 expression varied between the different cell lines (Figure 1A). Cell line CMT12 displayed a strong COX-2 signal while CMT28 had a moderately intense COX-2 expression, and all other cell lines showed faint to undetectable COX-2 signals (Figure 1A). PGE<sub>2</sub> production was determined and results paralleled those of COX-2 protein expression with PGE<sub>2</sub> synthesis by CMT12 significantly higher than PGE<sub>2</sub> production by other cell lines, and CMT28 producing moderate levels of PGE<sub>2</sub> (Figure 1B). Following this initial characterization, three cell lines were selected (CF35, CF33 and CMT12) to determine the effect of 24 and 48 h of serum starvation on COX-2 levels. Results showed a time-dependent reduction of COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> synthesis in all three cell lines after serum starvation (Figure 2A). However, although COX-2 transcripts in CF33 and CF35 dropped to very low levels after 24 h of serum starvation, high levels of COX-2 transcripts were still present in CMT12 cells, even after 48 h of serum deprivation (Figure 2A). Synthesis of PGE<sub>2</sub> by CMT12 was reduced, but still high, following serum starvation (Figure 2B).



*Effect of PMA on COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> synthesis in canine normal and neoplastic mammary cell lines.* For experiments looking at the effect of stimulation on COX-2 expression, CF33, CF35 and CMT12 were serum-starved for 40 h to decrease their basal levels of COX-2. Stimulation with PMA (5 ng/ml) resulted in a time-dependent induction of COX-2 in all three cell lines (Figure 3A). As shown in Figure 3A, induction of COX-2 by PMA was first observed at 3 h in CF35 and CF33 cells, and became maximal at 6 and 12 h. For CMT12, COX-2 transcript had slightly increased after 1 h, and a notable induction was present between 6 and 24 h of PMA stimulation (Figure 3A). A parallel induction of the COX-2 mRNA was observed at 6 h post-stimulation in CMT12, with the message still present at 24 h (Figure 4). As observed previously for basal COX-2 expression, the induction of COX-2 by PMA was significantly stronger in CMT12 compared to CF35 and CF33 cells (Figure 3A). PMA induction of COX-2 was accompanied by a correspondent increase in the synthesis of PGE<sub>2</sub> which was significantly higher in the neoplastic cell lines CF33 and CMT12 compared to CF35 cells (Figure 3B). Moreover, PGE<sub>2</sub> synthesis by CMT12 was significantly higher than PGE<sub>2</sub> production by the other two cell lines, CF33 and CF35. Immunocytochemical localization of COX-2 in CF35 cells revealed a faint COX-2 staining in unstimulated cells (Figure 5A), and a marked induction of COX-2 appearing as an intense cytoplasmic staining following 24 h of PMA stimulation (Figure 5B). In contrast, unstimulated CMT12 cells displayed a strong cytoplasmic COX-2 staining (Figure 5C), while no COX-1 was detectable in these cells (Figure 5D).

*Effect of selective and non-selective COX-2 inhibition on PGE<sub>2</sub> synthesis by COX-2-overexpressing canine neoplastic mammary cells.* NS-398 is a selective COX-2 inhibitor (Futaki et al. 1994) while indomethacin inhibits both COX-1 and COX-2, albeit with different potencies (Meade et al. 1993). Resveratrol is a phytoalexin found in grapes that has been shown to inhibit COX-1 (Jang et al. 1997), and possibly also COX-2 (Subbaramaiah et al. 1998). The effect of these COX inhibitors on PGE<sub>2</sub> synthesis and COX-2 expression in CMT12 cells was evaluated. All three inhibitors caused a dose-dependent and dramatic inhibition of PGE<sub>2</sub> synthesis in CMT12 after 24 h of treatment (Figure 6). The inhibition was observed at a concentration as low as 1  $\mu$ M of NS-398 and indomethacin while between 10 and 50  $\mu$ M of resveratrol were necessary to inhibit PGE<sub>2</sub> synthesis to the same extent (Figure 6). As expected, the inhibitors had no effect on COX-2 protein expression, except for a slight induction observed at the highest concentration of inhibitors (100 and 200  $\mu$ M) (Figure 6).

*Effect of selective and non-selective COX-2 inhibition on cell proliferation of COX-2-overexpressing canine neoplastic mammary cells.* The effect of the same COX inhibitors on cell proliferation was tested. Results showed that NS-398 caused a dose-dependent reduction of cell proliferation, which was significantly greater in CMT12 compared to CF35 only at the highest concentration of NS-398 (200  $\mu$ M) (Figure 7). Indomethacin also caused a diminution of cell proliferation that was significantly higher in CMT12 compared to CF35 between 50 and 200  $\mu$ M (Figure 7). Finally, surprisingly, resveratrol caused an increase in cell

proliferation of CMT12 at the lowest concentrations (1 to 50  $\mu\text{M}$ ), while a reduction of cell proliferation was observed at higher concentrations (Figure 7).

## DISCUSSION

The present study documents for the first time that some cell lines derived from canine mammary carcinomas constitutively overexpress COX-2. Of the five canine neoplastic cell lines that were analyzed, two expressed COX-2 at different levels of intensity. These *in vitro* results parallel our recent *in vivo* findings (Doré et al. 2003). In a study of 84 cases of canine malignant mammary tumors, we found that 56% of them were COX-2 positive (25% simple and 31% complex adenocarcinomas), with COX-2 staining localized principally to the epithelial neoplastic cells (Doré et al. 2003). The observation that COX-2 protein levels varies among cell lines is probably due to the COX-2 status of the tumor from which they were initially derived. In humans, the reported incidence of COX-2 expression in breast cancer tissues varies greatly, ranging from 4.5 to 100% depending on the study (Hwang et al. 1998; Parrett et al. 1997; Soslow et al. 2000; Masferrer et al. 2000; Ristimaki et al. 2002; Half et al. 2002). A proposed explanation for this important variation is that COX-2 positive breast tumor could represent a subset of breast tumors that are also HER-2-positive (Subbaramaiah et al. 2002). Two studies have so far looked at HER-2 expression in canine mammary tumors, and reported detection of HER-2 in 73.9 and 19.1% of malignant tumors (Ahern et al. 1996; Rungsipipat et al. 1999). The HER-2 status of the COX-2-positive malignant tumors in dogs is currently under investigation.

Of the five neoplastic cell lines, CMT12 showed the highest constitutive COX-2 expression and synthesized elevated amount of PGE<sub>2</sub>. Selective (NS-398) and non-selective (indomethacin) COX-2 inhibitors drastically reduced its

production of PGE<sub>2</sub> and decreased its proliferation, indicating that COX-2 is the major isoform involved in these processes. PGE<sub>2</sub> is the predominant metabolite produced by COX-2, and elevated levels of PGE<sub>2</sub> have been found in some canine mammary tumors (Mohammed et al. 2001). PGs have widespread effects and one of the possible consequences of increased PGE<sub>2</sub> synthesis by tumor cells could be to stimulate cell proliferation. PGE<sub>2</sub> has been shown to induce mitogenesis in mammary epithelial cells in the presence of EGF (Bandyopadhyay G et al. 1987). Evidence suggest that PGs overproduction could also stimulate proliferation through oestrogen production (Davies et al. 2002). In particular, PGE<sub>2</sub> has been demonstrated to increase the aromatase gene CYP19 that is responsible for oestrogen synthesis, and a positive correlation has been reported between COX expression and aromatase in human breast cancer specimens (Brueggemeier et al. 1999; Brodie et al. 2001). Additionally, COX-2 expression has been associated with inhibition of apoptosis in different cell types (Hsu et al. 2000; Sheng et al. 1998), a mechanism that could also contribute to the reduced cell proliferation observed with the COX-2 inhibitors. PGE<sub>2</sub> can also affect the immune system by depressing cell proliferation of T and B cells and cytokine synthesis, and by altering antigen processing by dendritic cells (Young 1994; Stolina et al. 2000), and appears to be implicated in the angiogenic process. A significant correlation has been reported between COX-2 and the vascular growth factor VEGF-189 mRNA copy numbers in invasive breast cancer specimen (Kirkpatrick et al. 2001).

Differences in constitutive COX-2 expression between the different neoplastic cell lines could reflect differences in the regulatory mechanisms. COX-2 expression is regulated at the transcriptional and post-transcriptional levels, and can also be regulated by the rate of protein synthesis and degradation (Howe et al. 2001). The human COX-2 promoter contains multiple transcription factors binding sites, including a cAMP response element, and potential binding sites for Myb, nuclear factor interleukin-6, nuclear factor 6B and Ets factors (Howe et al. 2001). The relative importance of these different factors is likely to vary in different tissues. A recent study revealed that PEA3 and cAMP response elements are required for HER-2/neu-mediated induction of transcription in human mammary epithelial cells (Subbaramaiah et al. 2002). Canine COX-2 has been characterized and sequenced (Boutemmine et al. 2002). The canine COX-2 coding region encodes a 604-amino acid protein, which is identical in length to that of human and all other known mammalian COX-2 proteins except ovine COX-2 that has only 603 residues (Zhang et al. 1996). Comparisons between canine and human COX-2 revealed an 89% identity at the amino acid level, with all putative structural and functional domains implicated in COX-2 function conserved in the canine protein (Boutemmine et al. 2002). The canine COX-2 promoter remains to be characterized. Eventual analyses and comparison of the canine COX-2 promoter between the different cell lines could help to understand the basis for the constitutive expression of COX-2 in some mammary cell lines.

In contrast to colon cancer where epidemiological evidence has established a correlation between the long term use of NSAID and a reduction in colon cancer incidence, such a link is not as clear for breast cancer. Indeed, some studies found no correlation between the use of NSAID and breast cancer incidence (Paganini-Hill et al. 1989; Thun et al. 1991; Egan et al. 1996). However, several studies have found an association between the use of NSAID and a reduction in the risk of breast cancer (Friedman et Ury 1980; Harris et al. 1996; Schreinemachers et Everson 1994; Sharpe et al. 2000; Cotterchio et al. 2001). In dogs, the only reported study linking NSAID and mammary tumors is a clinical trial treating dogs suffering from various types of cancer with piroxicam, a COX inhibitor. In this study, a partial remission was reported in one of three dogs displaying mammary carcinomas that was treated with piroxicam (Knapp et al. 1992).

One of the inhibitors tested, resveratrol, is a phytoalexin found in a variety of dietary plants including grapes and peanuts that appears to possess cancer chemopreventive effects (Jang et al. 1997). Resveratrol's anti-cancer property could be related in part to its ability to downregulate activation of NF- $\kappa$ B, to cause cell cycle arrest, and to trigger apoptosis (She et al. 2003). It has been shown that resveratrol can inhibit the PMA-induced COX-2 induction in human mammary epithelial cells (Subbaramaiah et al. 2002). Similarly, in our study, resveratrol was able to inhibit the PMA-stimulated PGE<sub>2</sub> synthesis in neoplastic mammary epithelial cells of canine origin. Such naturally occurring compounds and/or their derivatives may help find effective new agents for the chemoprevention or treatment of cancer.

In summary, we have shown that, as observed *in vivo* for canine mammary adenocarcinomas, there is variation in the level of COX-2 expression between different cell lines of canine mammary epithelial cells. Malignant mammary cells overexpressing COX-2 also produced elevated amount of PGE<sub>2</sub> that could contribute to the tumorigenic process, and the prostaglandin synthesis could be blocked by non-selective and selective COX inhibitors. Further understanding of the role played by prostaglandins in canine mammary tumors might offer new chemopreventive or chemotherapeutic avenues.



## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Stacia Kargman, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Pointe-Claire-Dorval, Québec for kindly providing antibody MF243, Ms. Danielle Rannou for technical assistance. This work was supported in part by grants from the American Kennel Club/Canine Health 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

- Ahern TE, Bird RC, Church Bird AE, Wolfe LG 1996 Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary malignant tumor and tumor-derived cell lines. *Amer J Vet Res* 57:693-696.
- Bandyopadhyay G, Imagawa W, Wallace D, Nandi S 1987 Linoleate metabolites enhance the in vitro proliferative responses of mouse mammary epithelial cells to epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 262:2750-2756.
- Bostock DE 1986 Canine and feline mammary neoplasms. *British Vet J* 142:506-515.
- Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR 1983 Canine mammary gland neoplasms *J Am Anim Hosp Assoc* 19:61-90.
- Boutemmine D, Bouchard N, D Boerboom, HE Jones, AK Goff, M Doré and J Sirois 2002 Molecular characterization of canine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation in prostatic adenocarcinoma cells *in vitro*. *Endocrinology* 143:1134-1143.
- Brodie AM, Lu Q, Long BJ, Fulton A, Chen T, Macpherson N, DeJong PC, Blankenstein MA, Nortier JW, Slee PH, van de Ven J, van Gorp JM, Elbers JR, Schipper ME, Blijham GH, Thijssen JH 2001 Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79:41-47.
- Brueggemeier RW, Quinn AL, Parrett ML, Joarder FS, Harris RE, Robertson FM 1999 Correlation of aromatase and cyclooxygenase expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett* 140:27-35.

- Cohen D, Reif JS, Brodey RS, Keiser H 1974 Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res* 34:2859-2868.
- Cotterchio M, Krieger N, Sloan M, Steinegart A 2001 Non-steroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:121-137.
- Davies G, Martin LA, Sacks N, Dowsett M 2002 Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Annals Oncol* 13:669-678.
- Egan KM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Rosner BA, Colditz GA 1996 Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 88:988-993.
- Friedman GD, Ury HK 1980 Initial screening for carcinogenicity of commonly use drugs. *J Natl Cancer Inst* 65:723-733.
- Funk CD 1993 Molecular biology in the eicosanoid field. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 45:67-98.
- 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/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* 47:55-59.
- Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Black MM 1983 Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Pathol* 20:127-142.

- Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA 2002 Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62:1676-1681.
- Hamilton JM 1974 Comparative aspects of mammary tumors. *Adv Cancer Res* 19:1-45.
- Harris RE, Namboodiri KK, Farrar WB 1996 Non-steroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer. *Epidemiology* 7:203-205.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AMC, Dannenberg AJ 2001 Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 8:97-114.
- Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS 2000 The cyclooxygenase-2 inhibitor célécoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 275:11397-11403.
- Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E 1998 Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:455-460.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Knighorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM 1997 Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218-220.

- Khan KN, Knapp DW, Denicola DB, Harris RK 2000 Expression of cyclooxygenase-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 cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol* 38:116-119.
- 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.
- Kirkpatrick K, Ogunkolade W, Elkak A, Bustin S, Jenkins P, Ghilchik M, Mokbel K 2001 The mRNA expression of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer. *Curr Med Res Opin* 18:237-241.
- Koki AT, Khan NK, Woerner BM, Seibert K, Harmon JL, Dannenberg AJ, Soslow RA, Masferrer JL 2002 Characterization of cyclooxygenase-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.
- Kundu N, Yang Q, Dorsey R, Fulton AM 2001 Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and activity in a murine model of metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 94:681-686.
- Doré M, Lanthier I, Sirois J, 2003 Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 40:207-212.

- 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.
- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T 2001 Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 276:18563-18569.
- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner M, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K 2000 Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 60:1306-1311.
- McEntee MF, Cates JM, Neilsen N 2002 Cyclooxygenase-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 (Cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 268:6610-6614.
- Mohammed SI, Coffman K, Glickman NW, Hayek MG, Waters DJ, Schlittler D, DeNicola DB, Knapp DW 2001 Prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64:1-4.
- Moulton JE 1990 Tumors of the alimentary tract. In: Moulton JE ed. *Tumors in domestic animals* 3<sup>rd</sup> ed. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, 518-552.
- Owen LN 1979 A comparative study of canine and human breast cancer. *Invest Cell Pathol* 2:257-275.

- Nieto A, Pena L, Perez-Alenza MD, Sanchez MA, Flores JM, Castano M 2000 Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 37:239-247.
- Paganini-Hill A, Chao A, Ross RK, Henderson BE 1989 Aspirin use and chronic diseases: a cohort study of the elderly. *Br Med J* 299:1247-1250.
- Parrett ML, Harris RL, Joader FS, Ross MS, Clausen KP, Robertson FM 1997 Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol* 10:503-508.
- Pestili de Almeida EM, Piché C, Sirois J, Doré M 2001 Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem* 49:867-875.
- Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isole J 2002 Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 62:632-635.
- Rungsipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi N, Hayashi T 1999 Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J Vet Med Sci* 61:27-32.
- Schneider R, Dorn CR, Taylor DO 1969 Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst* 43:1249-1261.

- Schreinemachers DM, Everson RB 1994 Aspirin use and lung, colon, and breast cancer. Incidence in a prospective study. *Epidemiology* 5:138-146.
- Sharpe CR, Collet JP, McNutt M, Belzile E, Boivin JF, Hanley JA. 2000 Nested case control study of the effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage. *Br J Cancer* 83:112-120.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN 1998 Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58:362-366.
- 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.
- Smith WL 1992 Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 263:F181-F191.
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL 1996 Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and-2. *J Biol Chem* 271:33157-33160.
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT 2000 Cyclooxygenase-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors. *Cancer* 89:2637-2645.
- Stolina M, Sharma S, Zhu L, Dubinett SM 2000 Lung cancer cyclooxygenase-2 dependent inhibition of dendritic cell maturation and function. *Proc Am Ass Cancer Res* 41:619.



- Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ 1998 Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 273:21875-21882.
- Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ 2002 Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer. Evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J. Biol. Chem.* 277:18649-18657.
- Subbaramaiah K, Dannenberg AJ 2003 Cyclooxygenase-2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends in Pharmacol Sci* 24:96-102.
- Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr 1991 Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 325:1593-1596.
- Tremblay C, Doré M, Bochsler PN, Sirois J 1999 Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 9:1398-1403.
- Turini ME, DuBois RN 2002 Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med* 53:35-57.
- Van Garderen E, de Wit M, Voorhout WF, Ruttman GR, Mol JA, Nederbragt H, Misdorp W 1997 Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *Am J Pathol* 150:1037-1047.

- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR 1991 Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production *Cancer Res* 51:2515-2520.
- Wolfe LG, Smith BB, Toivio-Kinnucan MA, Sartin EA, Kwapien RP, Henderson RA, Barnes S 1986 Biologic properties of cell lines derived from canine mammary carcinomas. *J Nat Cancer Inst* 77:783-792.
- 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.
- Young MR 1994 Eicosanoids and the immunology of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 13:337-348.
- Zhang V, O'Sullivan M, Hussain H, Roswit WT, Holtzman MJ 1996 Molecular cloning, functional expression, and selective regulation of ovine prostaglandin H-synthase-2. *Biochem Biophys Res Commun* 227:499-506.

Figure 1 : COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> synthesis in normal and neoplastic canine mammary epithelial cells. Normal (CF35) and neoplastic (CF33, CMT9, CF41, CMT28 and CMT12) canine mammary epithelial cells were cultured in complete medium, as described in Materials and Methods. (A) Cell extracts were prepared from cultures, and proteins (50 µg/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE, and immunoblotting techniques using a COX-2 selective antibody. Results from a representative experiment are shown. Markers on the right indicate migration of intact COX-2 protein ( $M_r = 72,000$ ). (B) Concentrations of PGE<sub>2</sub> in culture medium were determined. Results are presented as picogram of PGE<sub>2</sub> per microliter of media for one experiment.

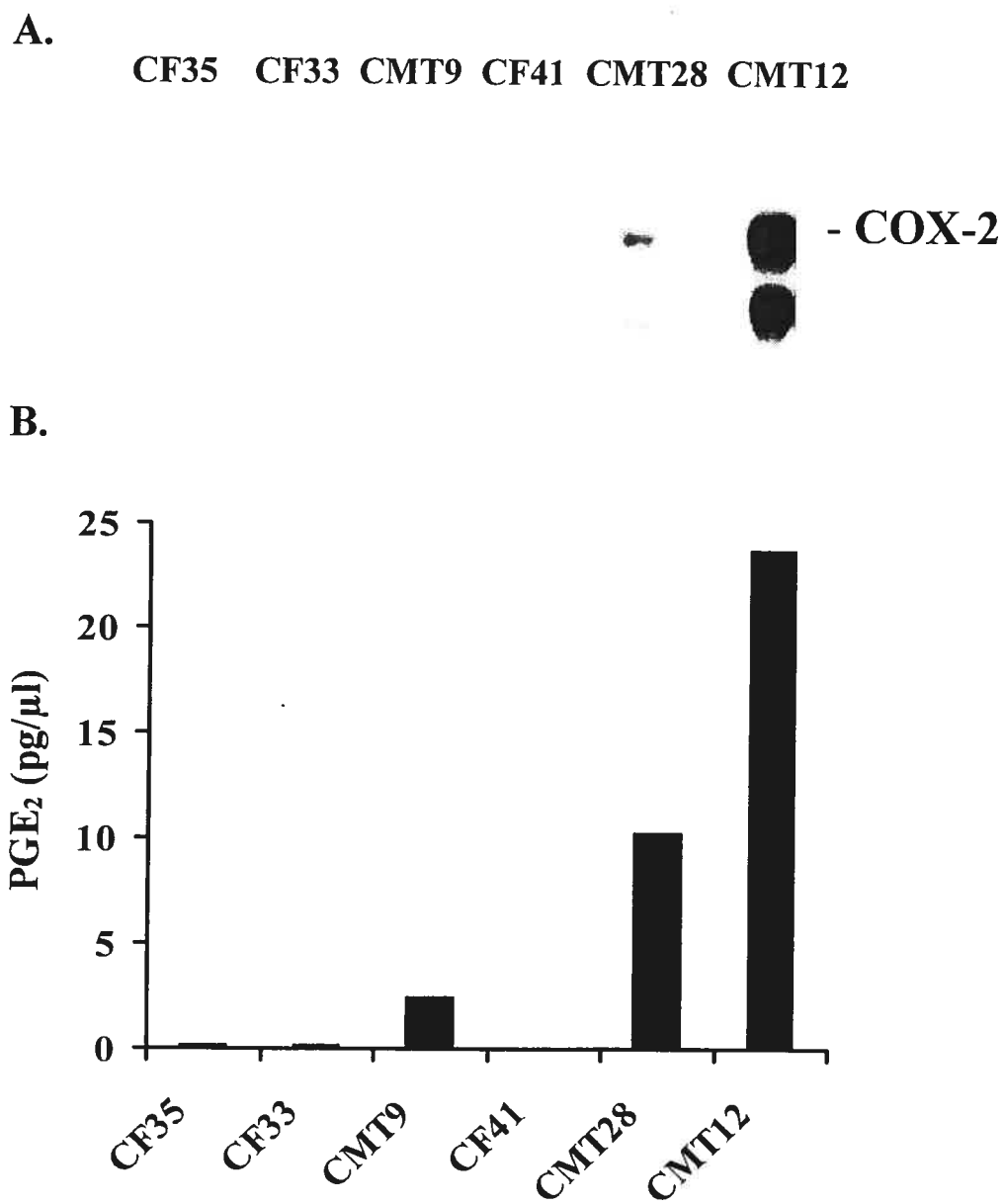


Figure 1

Figure 2 : Effect of serum deprivation on COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> synthesis in normal and neoplastic canine mammary epithelial cells. Normal (CF35) and neoplastic (CF33 and CMT12) canine mammary epithelial cells were cultured in complete medium (time 0) or in serum-deprived medium for 24 or 48 h, as described in Materials and Methods. (A) Cell extracts were prepared from cultures, and proteins (50 µg/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 for CMT12 and for three independent experiments for CF35 and CF33. Markers on the right indicate migration of intact COX-2 protein ( $M_r = 72,000$ ). (B) Concentrations of PGE<sub>2</sub> in culture medium were determined. Results are presented as picogram of PGE<sub>2</sub> per microliter of media (mean ± SD of duplicate cultures from two (CMT12) and three (CF35 and CF33) independent experiments).

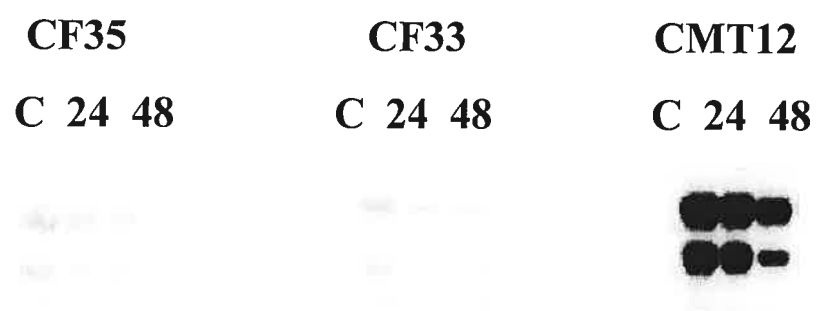
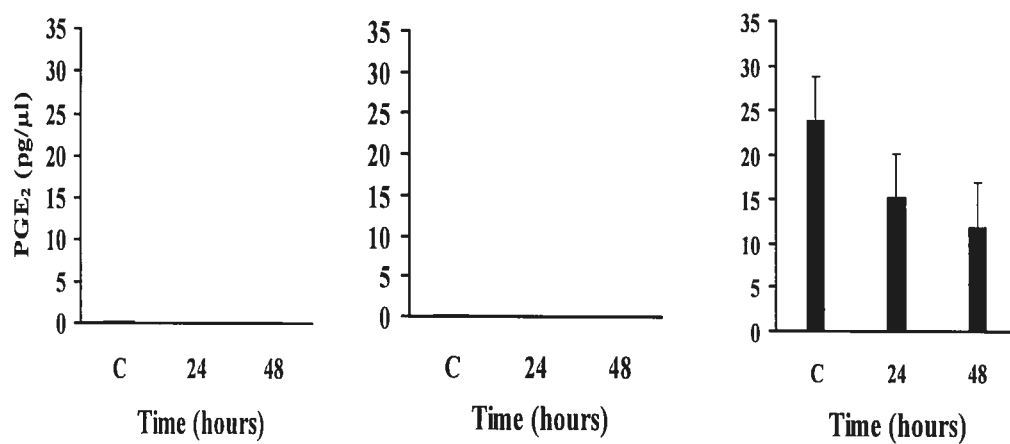
**A.****B.**

Figure 2

Figure 3 : Time-dependent induction of COX-2 protein and PGE<sub>2</sub> synthesis by PMA in normal and neoplastic canine mammary epithelial cells. Normal (CF35) and neoplastic (CF33 and CMT12) canine mammary epithelial cells were serum starved for 40 hours, 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 (50 µg/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 independent experiments. Markers on the right indicate migration of intact COX-2 protein ( $M_r = 72,000$ ). (B) Concentrations of PGE<sub>2</sub> in culture medium were determined. Results are presented as picogram of PGE<sub>2</sub> per microliter of media (mean ± SD of duplicate cultures from two independent experiments).

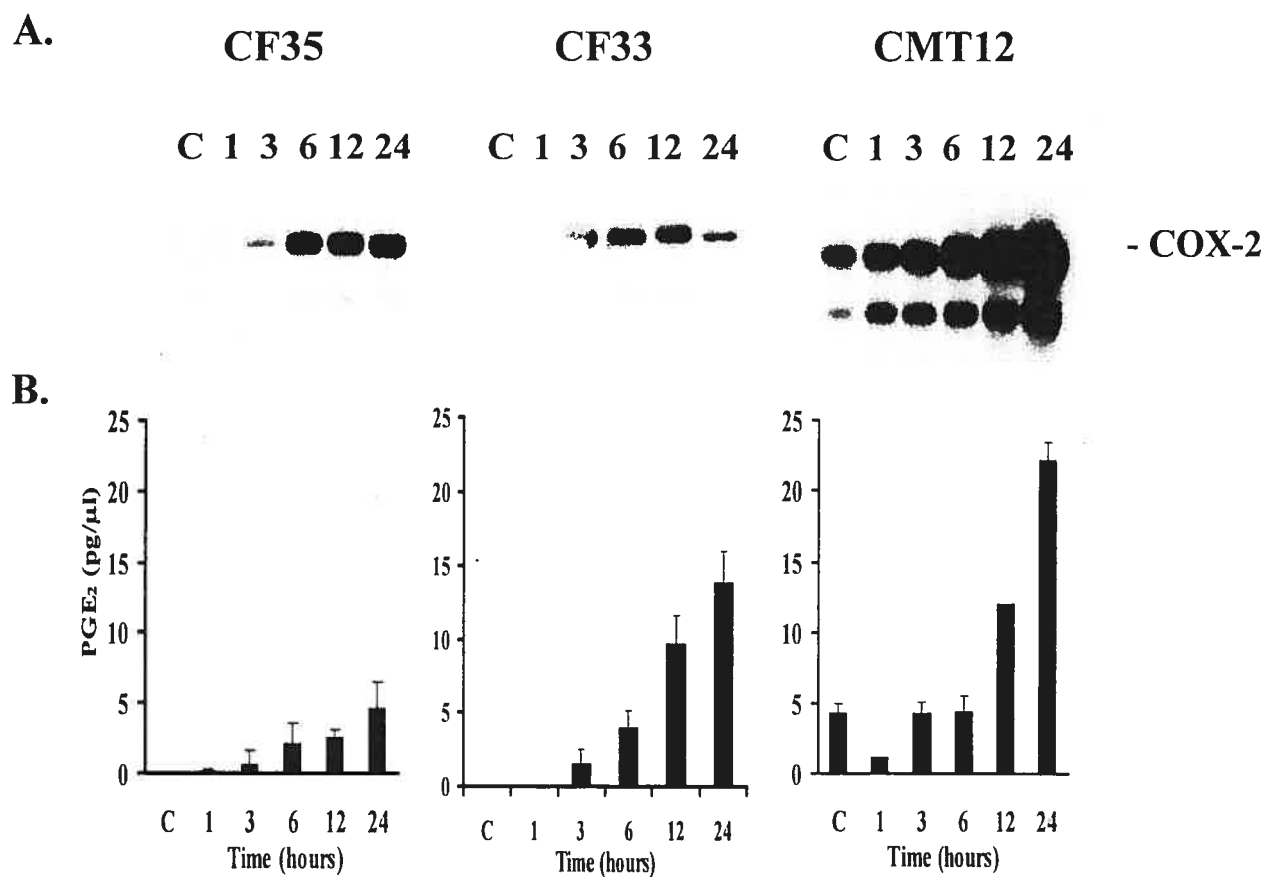


Figure 3



Figure 4 : Time-dependent induction of COX-2 mRNA by PMA in CMT12 cells. Neoplastic (CMT12) canine mammary epithelial cells were serum starved for 40 hours, 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. Total RNA extracts were prepared, and analyzed for COX-2 and GAPDH (control gene) content by a semiquantitative RT-PCR/Southern blotting technique, as described in Materials and Methods. Results were obtained for one experiment.

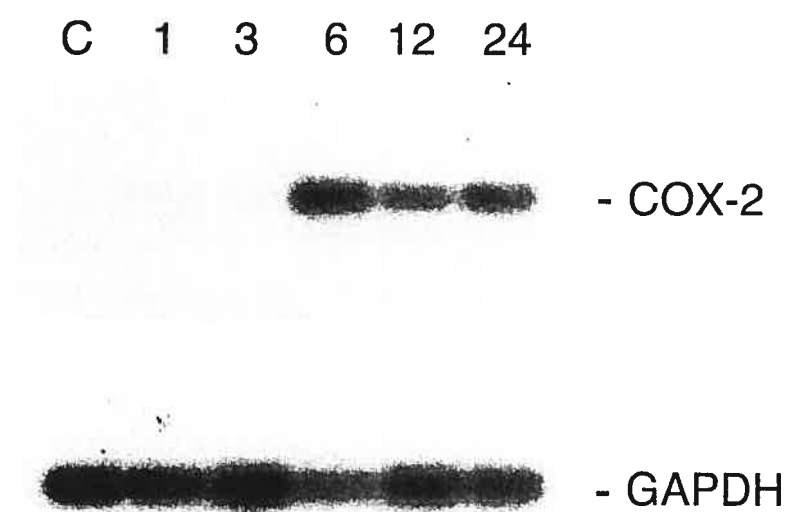


Figure 4

Figure 5 : Immunocytochemical detection of COX-2 in normal and neoplastic canine mammary epithelial cells. Immunocytochemistry was performed on normal (CF35) or neoplastic (CMT12) canine mammary epithelial cells 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 faint COX-2 immunoreactivity in unstimulated CF35 (A), that increased after PMA stimulation (B). Unstimulated CMT12 displayed strong COX-2 staining (C), but no COX-1 (D). Control staining with rabbit serum or PBS was negative (data not shown). Results are representative of two independent experiments.

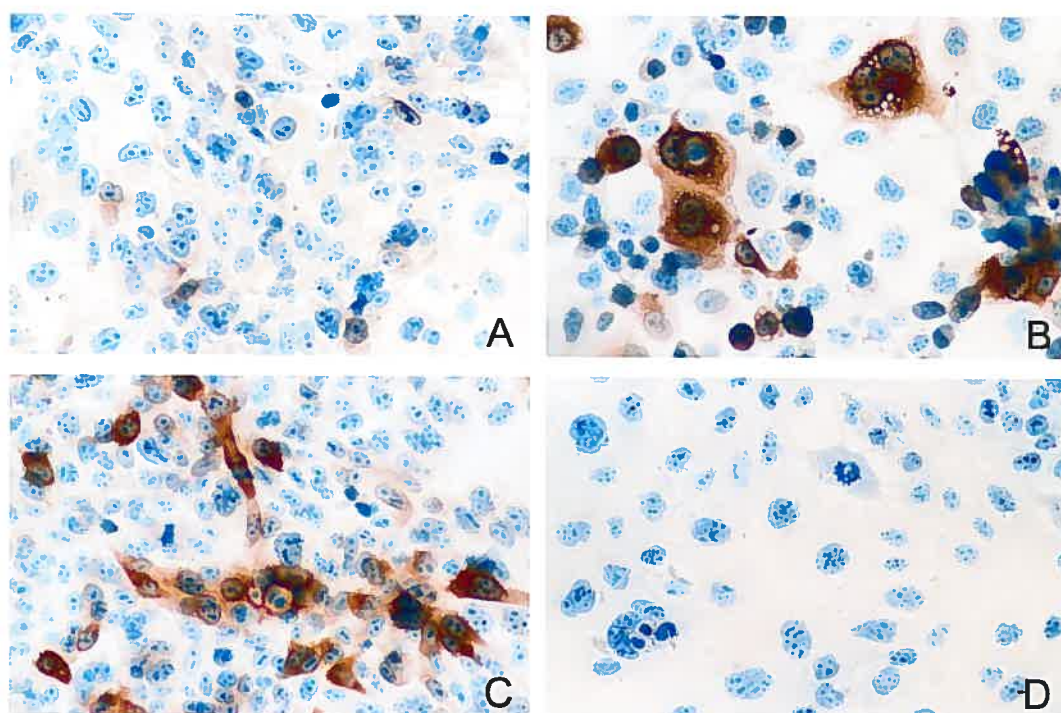


Figure 5

Figure 6 : Effect of COX inhibition on PGE<sub>2</sub> synthesis by canine neoplastic mammary epithelial cells. Neoplastic (CMT12) canine mammary epithelial cells were cultured in the absence (0) or presence of 1, 10, 50, 100 or 200 µg/ml resveratrol, indomethacin or NS-398 for 24 h, as described in Materials and Methods. (A) Cell extracts were prepared from cultures, and proteins (50 µg/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE, and immunoblotting techniques using a COX-2 selective antibody. Results from a representative experiment are shown. Results were obtained for one experiments. Markers on the right indicate migration of intact COX-2 protein (M<sub>r</sub> = 72,000). (B) Concentrations of PGE<sub>2</sub> in culture medium were determined. Results are presented as picogram of PGE<sub>2</sub> per microliter of media (from one experiment).

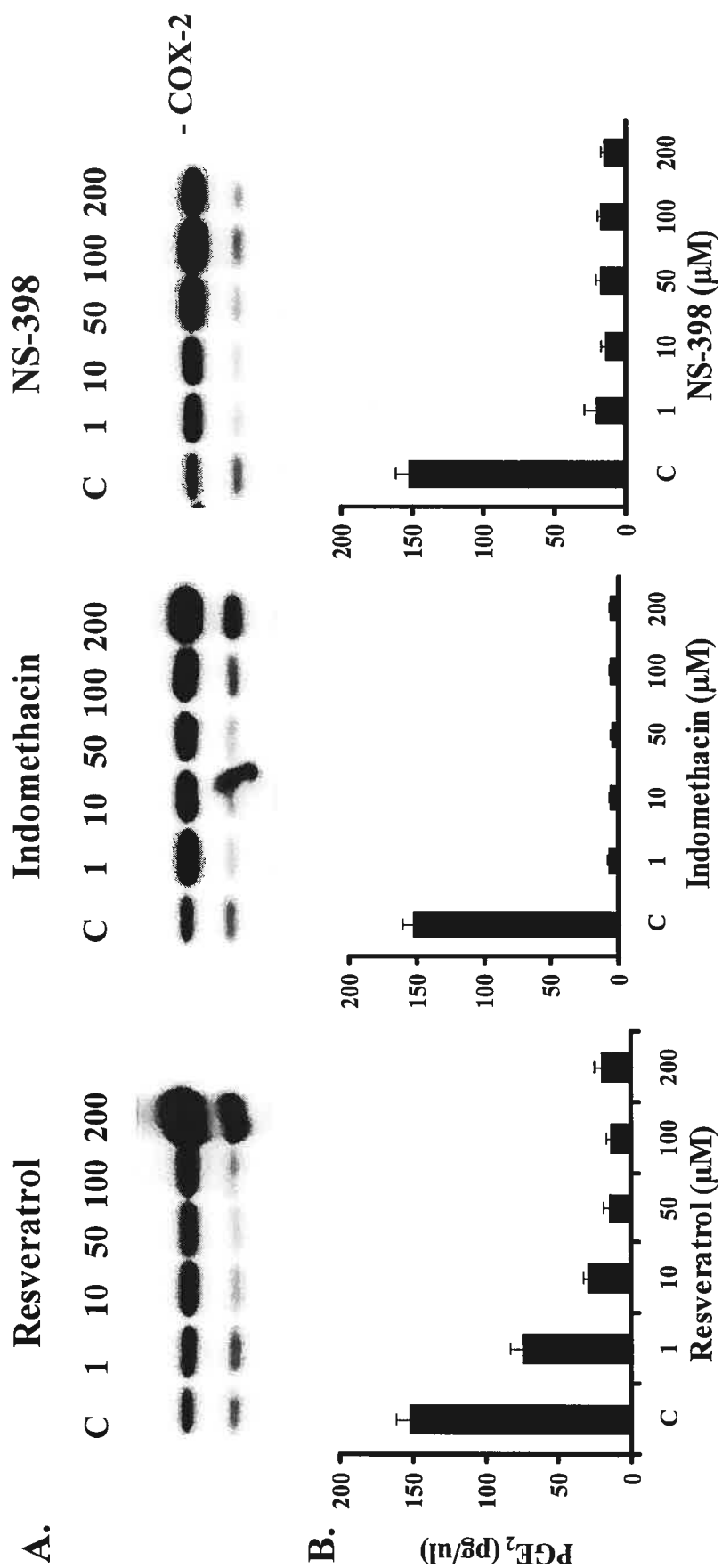
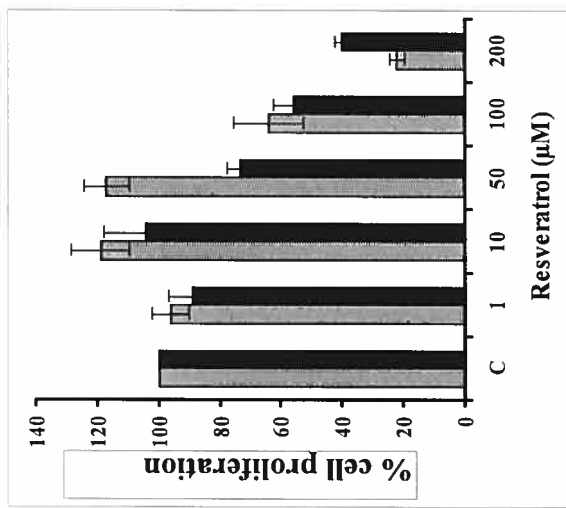


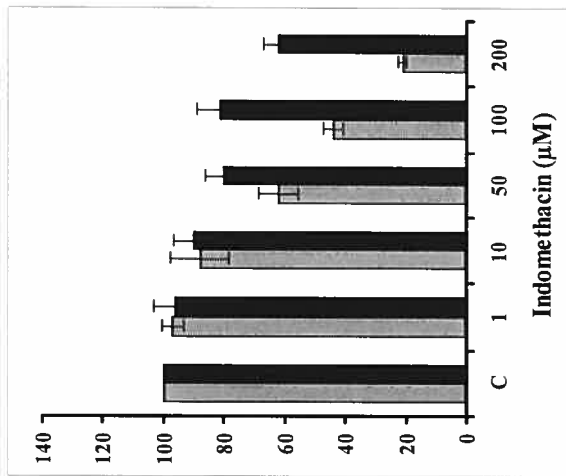
Figure 6

Figure 7 : Effect of COX inhibition on cell proliferation of neoplastic canine mammary epithelial cells. Neoplastic (CMT12) canine mammary epithelial cells were cultured in the absence (0) or presence of 1, 10, 50, 100 or 200  $\mu\text{g/ml}$  resveratrol (A), indomethacin (B) or NS-398 (C) 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 4 h at 37°C. Spectrophotometric absorbance of the samples was measured with a microtiter plate reader at a wavelength of 450 nm. Cell proliferation is expressed as a percentage compared to control cultures without inhibitor (mean  $\pm$  SD of duplicate cultures from three independent experiments).

**A. Resveratrol**



**B. Indomethacin**



**C. NS-398**

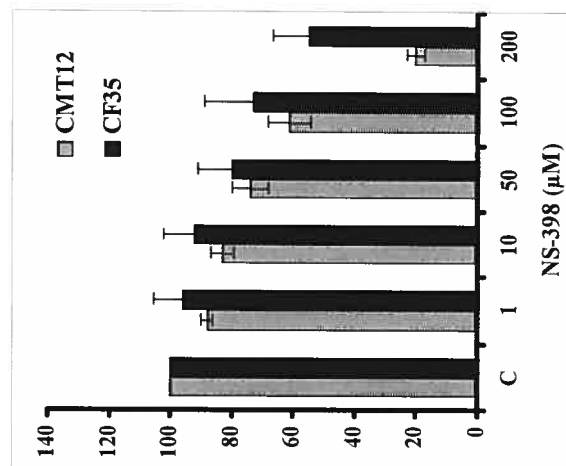


Figure 7



## Discussion

Jusqu'à présent, la surexpression de la COX-2 a été démontrée dans plusieurs types de néoplasmes canins incluant les adénocarcinomes de la prostate (Tremblay et al., 1999), les carcinomes spinocellulaires (Pestili de Almeida et al., 2001), les carcinomes rénaux (Khan et al., 2001), les carcinomes vésicaux (Khan et al., 2000), les carcinomes intestinaux (McEntee et al., 2002) ainsi que les tumeurs malignes mammaires (Doré et al., 2003).

La présente étude démontre l'expression de la COX-2 dans des cellules épithéliales mammaires canines normales et néoplasiques *in vitro*. L'expression de la COX-2 a été étudiée dans cinq lignées de cellules mammaires néoplasiques, et deux de ces lignées exprimaient un niveau plus élevé de COX-2 comparativement aux cellules normales. En particulier, la lignée cellulaire néoplasique CMT12 exprimait de manière constitutive de hauts niveaux de COX-2. Une variation du niveau d'expression de la COX-2 a été observée dans les différentes lignées néoplasiques. Cette variation du niveau de COX-2 cellulaire fut aussi observée dans l'étude immunohistochimique de tumeurs mammaires canines (Doré et al., 2003). En effet, cette étude a démontré que 24% des adénomes mammaires exprimaient faiblement la COX-2 alors que plus de 50% des tumeurs malignes (carcinomes) exprimaient à différents degrés d'intensité (de faible à fort) la COX-2. Dans les cas de cancer du sein chez l'humain, l'expression de la COX-2 varie de 5% (Hwang et al., 1998), 38% (Ristimäki et al., 2002) à 100% (Parrett et al., 1997). Chez l'humain, cette variation de l'expression de la COX-2 pourrait être due au fait que l'induction de la COX-2 serait présente dans les cancers qui

surexpriment simultanément la protéine *HER-2* (Elsner et al., 1998). Les facteurs impliqués dans l'expression de la COX-2 dans les cellules tumorales ainsi que le rôle de cette protéine dans la carcinogenèse ne sont pas actuellement clairement compris. Des études provenant de modèles de tumorigénèse mammaire chez les souris (Liu et al., 2001) et de modèles de lignées cellulaires mammaires humaines (Kargman et al., 1996; Parrett et al., 1997; Hwang et al., 1998) suggèrent un lien entre la surexpression de la COX-2 et la pathogenèse du cancer du sein.

La différence dans le niveau d'expression de la COX-2 entre les différentes lignées cellulaires pourrait s'expliquer par une différence dans la régulation du promoteur du gène de la COX-2. La région 5' du gène de la COX-2 humaine contient plusieurs sites de liaison pour des facteurs régulant l'expression de la COX-2, tels que les sites NK-kB liant le facteur nucléaire kB, NF-IL6 liant Myb et CRE liant le CREB. Peu d'études ont investigué la régulation du promoteur de la COX-2 dans le cancer du sein. Une étude intéressante démontre que HER-2/neu stimule la transcription de la COX-2 par la voie Ras suite à la liaison de AP-1 au CRE dans des cellules mammaires humaines en culture (Sabbaramaiah et al., 2002). La contribution du facteur PEA3 dans la transcription de la COX-2 a aussi été investiguée dans la même étude. Un site de liaison PEA3 (-75/-72) a aussi été identifié près de CRE. Une seconde étude démontre que l'induction de COX-2 causée par le PMA implique le site CRE dans le promoteur de la COX-2. Le traitement avec du PMA augmente la protéine AP-1 qui liera c-Jun, c-Fos, et ATF-2 pour finalement aller lier le site CRE (Sabbaramaiah et al., 2001).

L'augmentation de l'expression de la COX-2 est accompagnée d'une augmentation de son activité enzymatique et de l'augmentation de la capacité des tissus à synthétiser des PGs (DeWitt, 1991). Effectivement, l'induction de l'expression de la COX dans le cancer du sein chez l'humain fut suggérée à l'origine par la découverte d'importantes concentrations de PGE<sub>2</sub> dans les tumeurs. De nombreux rapports supportent maintenant le rôle de la COX-2 dans la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> dans le cancer du sein (Bennett et al., 1977; Rolland et al., 1980; DeWitt, 1991; Bishop et al., 1980; Gunasegaram et al., 1981; Karmali et al., 1983; Levine, 1981). La PGE<sub>2</sub> est depuis peu reconnue comme un médiateur de la carcinogénèse (Vane et al., 1998; Marnett, 1992; Taketo, 1998) en 1) influençant le contrôle de la croissance cellulaire; 2) rendant les cellules résistantes à l'apoptose; 3) supprimant la reconnaissance immunitaire; 4) permettant l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire qui a comme effet d'augmenter les métastases; et 5) induisant l'angiogénèse (Stephen et al., 2000; Badawi, 2000). Nos résultats démontrent que la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> de certaines cellules mammaires néoplasiques est dans la majorité des cas supérieure à celle de la lignée normale. En accord avec ces résultats, une étude récente sur les néoplasmes mammaires canins rapportait des niveaux élevés de PGE<sub>2</sub> dans 38% des carcinomes mammaires canins analysés (Mohammed, 2001). Nos résultats démontrent que le niveau d'expression de la COX-2 et la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> sont diminués par une culture sans sérum et augmentés par le traitement avec un promoteur de tumeur, le PMA. Plusieurs études démontrent effectivement que le PMA permet l'induction de la transcription de la COX-2 et du fait même la

biosynthèse de PGE<sub>2</sub> dans des lignées cellulaires épithéliales mammaires humaines normales (Subbaramaiah et al., 1998) autant que néoplasiques (Liu et Rose, 1996).

Notre étude démontre aussi que de faibles concentrations d'inhibiteurs de la COX sont suffisantes pour bloquer la presque totalité de la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> des cellules néoplasiques CMT12 qui surexpriment la COX-2. Le NS-398 (inhibiteur sélectif à la COX-2), le resvératrol et l'indométacine (deux inhibiteurs non-sélectifs à la COX-2) ont comparativement eu le même effet sur la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> des cellules CMT12. Ce résultat indique que la COX-2 est l'isoforme principalement impliquée dans la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> par ces cellules. Ce résultat rejoint les observations de DeWitt (1991) indiquant que les AINS inhibent la biosynthèse cellulaire de PGE<sub>2</sub> en bloquant l'activité enzymatique de la COX-2. L'analyse par immunobuvardage des cellules mammaires canines néoplasiques traitées avec les différents inhibiteurs démontre l'expression constante de la protéine COX-2. La légère induction de COX-2 observée aux plus fortes concentrations d'inhibiteurs est possiblement dûe aux faibles niveaux de PGE<sub>2</sub> produits qui agissent possiblement comme rétrocontrôle positif. Le pouvoir des inhibiteurs sur la production de PGE<sub>2</sub> est donc dû à leur effet au niveau enzymatique et non au niveau de l'expression protéique. Une étude intéressante de Yuan et al. (2000) démontre des résultats similaires. Ce groupe de recherche propose que les AINSs inhibent la production de PGs par une double action ; premièrement sur la COX-2 et deuxièmement sur la PLA<sub>2</sub>. Cette étude fut la première démontrant que les AINS agissent sur l'expression de l'ARNm de COX-

2 induit par PLA<sub>2</sub> en plus de supprimer drastiquement l'activité catalytique de la COX-2 (Vane et al., 1994) et de 2) et arrêter l'expression de l'ARNm de cPLA<sub>2</sub> (Ledwith et al., 1997).

L'utilisation d'AINS démontre une corrélation positive entre l'activité enzymatique de la COX-2 et la prolifération cellulaire. Le traitement de la lignée CMT12, ayant une croissance extrêmement rapide, avec des AINS démontre un effet marqué sur la croissance cellulaire comparativement à leur effet sur les cellules normales (CF35) ayant un faible niveau d'expression de COX-2. Les trois différents inhibiteurs (NS-398, resvératrol et indométacine) ne démontrent pas d'effet différent sur la prolifération cellulaire et ce, dans les deux lignées cellulaires étudiées. L'absence de différence sur la prolifération cellulaire avec la spécificité de l'inhibiteur suggère que la COX-2 est impliquée dans la croissance cellulaire. Une étude démontre que l'activité enzymatique de la COX-2, et non de la COX-1, et la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> lui étant associée, contribuent de différentes façons à la carcinogenèse, incluant la stimulation de la croissance cellulaire (Bandyopadhyay et al., 1987). Une étude intéressante de Liu et al. (1998) a démontré que le NS-398, un inhibiteur hautement spécifique à la COX-2, induit l'apoptose et cause la diminution de la biosynthèse de bcl-2 (une oncoprotéine anti-apoptotique) dans une lignée cellulaire néoplasique prostatique. La diminution de la prolifération cellulaire observée sur la lignée néoplasique CMT12 est possiblement dûe à ce mécanisme.

Des études épidémiologiques chez l'humain sur la relation entre la prise régulière d'AINS et l'incidence du cancer du sein ont démontré des résultats

contradictoires. Trois études n'ont pu démontrer de relation entre la prise d'aspirine et les risques de cancer du sein (Paganini-Hill et al., 1989; Thun et al., 1991; Egan et al., 1996) alors que d'autres études démontrent une corrélation positive entre la consommation d'AINS sur une base quotidienne et la diminution de l'incidence du cancer du sein (Friedman et Ury, 1980; Harris et al., 1996; Schreinemachers et Everson, 1994; Sharpe et al., 2000). Une explication possible de ces différences est que la surexpression de COX-2 dans les tumeurs du sein n'est pas un phénomène aussi constant et important que dans le cas d'adénocarcinomes colorectaux et que seulement une faible proportion des cancers du sein serait sensible aux AINS.

En résumé, cette étude démontre que la COX-2 est exprimée de manière constitutive dans certaines lignées cellulaires néoplasiques mammaires canines. Ces résultats suggèrent que l'expression de la COX-2 joue un rôle clé dans la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> et dans la prolifération de ces lignées cellulaires et que la COX-2 serait impliquée dans la carcinogenèse mammaire canine, tout comme dans le cancer du sein humain. Cette étude représente la première démonstration *in vitro* de l'expression de la COX-2 dans des cellules épithéliales mammaires néoplasiques canines. La COX-2 pourrait être un marqueur valable pour la détection préventive des tumeurs malignes mammaires canines et les AINS seraient aussi des médiateurs potentiels pour le traitement des tumeurs mammaires canines.

## Conclusion

Cette étude représente la première démonstration *in vitro* de l'expression de la COX-2 dans des cellules épithéliales mammaires néoplasiques canines. Ce projet démontre aussi que l'expression de la COX-2 est reliée à la biosynthèse de la PGE<sub>2</sub> et que les AINS permettent de diminuer la production de PGE<sub>2</sub> et la prolifération cellulaire. Les analyses d'immunobuvardage de type Western ont montré que le niveau d'expression de la COX-2 est variable parmi les cinq lignées cellulaires néoplasiques. La lignée cellulaire néoplasique CMT12 exprime de manière constitutive de hauts niveaux de COX-2. L'analyse du niveau d'expression de la COX-2 d'un plus grand nombre de lignées cellulaires épithéliales mammaires canines permettrait de déterminer si statistiquement la COX-2 est exprimée majoritairement dans les cellules néoplasiques. De plus, une étude plus approfondie au niveau du promoteur du gène de la COX-2 permettrait de déterminer les éléments impliqués dans la régulation et d'expliquer la différence entre le niveau d'expression de la COX-2 dans les lignées cellulaires. Peu d'études ont jusqu'à ce jour investigué la régulation du promoteur de la COX-2 dans le cancer du sein et aucune dans les tumeurs malignes mammaires canines.

Cette étude indique que la propriété des AINS d'inhiber la production de PGE<sub>2</sub> s'explique par un effet au niveau enzymatique et non au niveau de la régulation de l'expression de la protéine. De faibles concentrations d'AINS sont suffisantes pour bloquer la biosynthèse de PGE<sub>2</sub> des cellules néoplasiques CMT12 qui surexpriment la COX-2. Notre étude avec les AINS démontre aussi une

corrélation positive entre l'activité enzymatique de la COX-2 et la prolifération cellulaire. Le traitement de la lignée CMT12, à la croissance extrêmement rapide, avec des AINS démontre une diminution de la croissance cellulaire considérable comparé à leur effet sur les cellules normales ayant un faible niveau d'expression de la COX-2.



## Bibliographie

- Arita H, Nakano T, Hanasaki K: Thromboxane A<sub>2</sub>: Its generation and role in platelet activation. *Prog Lipid res* 28: 273-301, 1989.
- Badawi AF: The role of prostaglandin synthesis in prostate cancer. *Br J Urol Int* 85: 451-462, 2000.
- Bandyopadhyay GK, Imagawa W, Wallace D, Nandi S: Linoleate metabolites enhance the *in vitro* proliferative response of mouse mammary epithelial cells to epidermal growth factor. *J Biol Chem* 262: 2750-2756, 1987.
- Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB: Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappa B, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res* 62: 4945-4954, 2002.
- Basu TK, Sasmal P: Plasma vitamin A, retinol-binding protein, and prealbumin in postoperative breast cancer patients. *Int J Vit Nutr* 58: 281-283, 1988.
- Battu S, Rigaud M, Beneytout J: Resistance to apoptosis and cyclooxygenase-2 expression in a human adenocarcinoma cell line HT29 CL19A. *Anticancer Res* 18: 3579-3583, 1998.
- Bennett A, Charlier EM, McDonald AM, Simpson JS, Stamford IF, Zebro T: Prostaglandin and breast cancer. *Lancet* 2: 624-626, 1977.
- Bishop HM, Haynes A, Evans DF, Elston CW, Johnson J, Blamey RW: Radioimmunoassay of prostaglandin E<sub>2</sub> in primary breast cancer and its relationship to histological grade. *Clin Oncol* 6: 380-381, 1980.

- Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, Abreu-Goris M, Newmark HL, Lipkin ML, DeCosse JJ, Bertagnolli M: Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 56: 2556-2560, 1996.
- Bostock DE : Canine and feline mammary neoplasms. *Br Vet J* 142: 506-515, 1986.
- Boutemmine D, Bouchard N, Boerboom D, Jones HE, Goff AK, Doré M, Sirois J: Molecular characterization of canine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation in prostatic adenocarcinoma cells in vitro. *Endocrinology* 143: 1134-1143, 2002.
- Bracken KE, Elger W, Jantke I, Nanninga A, Gellersen B: Cloning of guinea pig cyclooxygenase-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acids: steroid-modulated gene expression correlates to prostaglandin F2 alpha secretion in cultured endometrial cells. *Endocrinology* 138:237-47, 1997.
- Breitner JCS: The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 47: 401-411, 1996.
- Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR: Canine mammary neoplasm. *J Am Vet Med Assoc* 19: 61-90, 1983.
- Brodey RS, Fildler IJ, Howson AE: The relationship of estrus irregularity, pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *J Am Vet Med Assoc* 149: 1047-1104, 1966.

- Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP: COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 19: 723-729, 1998.
- Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y: Endothelial cells of the brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 $\beta$ : a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res* 733: 263–272, 1996.
- Cao Y, Prescott SM: Many action of Cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *Journal of Cellular Physiology* 190: 279-286, 2002.
- Chalbos D, Philips A, Rochefort H: Genomic cross-talk between the estrogen receptor and growth factor regulatory pathways in estrogen target tissues. *Semin Cancer Biol* 5: 361-368, 1994.
- Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dennenberg AJ: Cyclooxygenase-2 expression is upregulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 59: 991-994, 1999.
- Chandrasekhara NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL: From the Cover: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13926-13931, 2002.

- Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O, Langenbach R: Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res* 60: 4705-4708, 2000.
- Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, Graves-Deal R, Daniel VC, Dempsey PJ, Chinery R, Kirkland SC, DuBois RN, Jetton TL, Morrow JD: Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 657-662, 1997.
- Cohen D, Reif JS, Brodey RS, Keiser H: Epidemiological analysis of most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res* 34(11): 2859-2868, 1974.
- Colditz GA: Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J Nat Cancer Inst* 90: 814-822, 1998.
- Dannenber AJ, Zakim D: Chemoprevention of colorectal cancer through inhibition of cyclooxygenase-2. *Semin Oncol* 26: 499-504, 1999, Review.
- DeWitt DL, Smith WL: Primary structure of prostaglandin G/H synthetase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1412-1416, 1988.
- DeWitt DL: Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* 1083: 121-134, 1991.

- DeWitt DL, Meade EA, Smith WL: PGH synthetase isoenzyme selectivity : a potential for safer nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Med* 95:40S-44S, 1993.
- Donnay I, Rauis J, Devleeschouwer N, Wouters-Ballman P, Leclercq G, Verstegen J: Comparaison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am J Vet Res* 56: 1188-1194, 1995.
- Doré M, Lanthier I, Sirois J: Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 40: 207-212, 2003.
- Dorn CR, Taylor DON, Schneider R, Hibbard HH, Klauder MR: Survey of neoplasm in Alameda and Contra Costa Counties, California II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Natl Cancer Inst* 40: 307-318, 1968.
- DuBois RN, Awad J, Morrow J, Roberts LJ, Bishop PR: Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. *J Clin Invest* 93: 493-498, 1994.
- DuBois RN, Smalley WE: Cyclooxygenase, NSAIDs, and colorectal cancer. *J Gastroenterol* 31: 898-906, 1996.
- DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE: Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12: 1063-1073, 1998.

- Eberhart CE, Coffey RJ, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN: Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107: 1183-1188, 1994.
- Egan KM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Rosner BA, Colditz GA: Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 88: 988-993, 1996.
- Elsner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Aso H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler P: Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8806-8811, 1998.
- Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E, Wilson CB, Hwang D: Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys* 307: 361-368, 1993.
- Filder IJ, Brodey RS: A necropsy of canine malignant mammary neoplasms. *JAVMA* 151: 710, 1967.
- Fosslien E: Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system. *Ann Clin Lab Sci* 28: 67-81, 1998.
- Fosslien E: Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 37: 431-502, 2000.
- Fosslien E: Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 30: 3-21, 2000.

- Friedman GD, Ury HK: Initial screening for carcinogenicity of commonly used drugs. *J Natl Cancer Inst* 65: 723-733, 1980.
- Frye FL, Dorn CR, Taylor DON, Hibbard HH, Klauber MR: Characteristics of canine mammary gland tumor cases. *Anim Hosp* 3: 1-12, 1967.
- Funk CD: Molecular biology in the eicosanoid field. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 45: 67-98, 1993.
- Gately S: The contribution of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer and Metastasis* 19: 19-27, 2000.
- Gilbertson SR, Kurtzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Blak MM: Canine mammary epithelial neoplasms: Biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Vet Patho* 20: 127-142, 1983.
- Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC: Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 121: 241-246, 1994.
- Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE: Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Eng J Med* 333: 609-614, 1995.
- Griswold DE, Adams JL: Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev* 16: 181-206, 1996.
- Gunasegaram R, Loganath A, Peh KL, Chiang SC, Ratnam SS: Identification of prostaglandins in infiltrating duct carcinoma of the human breast. *IRCS Med Sci* 8:747-748, 1981.

- Gupta RA, DuBois RN : Combinations for cancer prevention. *Nat Med* 6: 974-975, 2000.
- Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DJ, Mukhtar H: Over-expression of Cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 42: 73-78, 2000.
- Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA: Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62:1676-1681, 2002.
- Hamilton JM: Comparative aspects of mammary tumors. *Adv Cancer Res* 19: 1-45, 1974.
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, DuBois RN, Breyer MD: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increased with salt restriction. *J Clin Invest* 94: 2504-2510, 1994.
- Harris RE, Namboodiri KK, Farrar WB: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer. *Epidemiology* 7: 203-205, 1996.
- Harris RE, Alshafie GS, Abou-Issa H, Seibert K: Chemoprevention of breast cancer in rats by Célécóxib, a COX-2 inhibitor. *Cancer Res* 60: 2101-2103, 2000.
- Helmer M, Lands WE: Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the haloenzyme. *J Biol Chem* 251: 5575-5579, 1976.
- Herschman HR: Regulation of prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2. *Cancer Metastasis Rev* 13: 241-256, 1994.



- Hirayama T: Epidemiology of breast cancer with specific reference to the role of diet. *Prev Med* 7: 173-195, 1978.
- Hirst JJ, Teixeira FJ, Zakar T, Olson DM: Prostaglandin endoperoxide-H synthase-1 and -2 messenger ribonucleic acid levels in human amnion with spontaneous labor onset. *J Clin Endocrinol metab* 80: 517-523, 1995.
- Hla T, Neilson K: Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7384-7388, 1992.
- Hong SL, Wheless CM, Levine L: Elevated prostaglandin synthetase activity in metahylcholanthrene-transformed mouse BALB/3T3. *Prostaglandins* 13: 271-279, 1977.
- Howe GR: High fat diet and breast cancer risk. *J Am Med Ass* 286: 2080-2081, 1992.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AMC, Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 8: 97-114, 2001.
- Huang M, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM: Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandins E<sub>2</sub> enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. *J Immunol* 157: 5512-5520, 1996.
- Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E: Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90: 455-460, 1998.

- Jung TTK, Berlinger N T, Juhn SK: Prostaglandins in squamous cell carcinoma of head and neck: a preliminary study. *Laryngoscope* 95: 307-312, 1985.
- Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Evans J, Mancini J, O'Neill G: Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 111: 445-454, 1996.
- Karmali RA, Walt S, Thaler HT, Lefever F: Prostaglandins in breast cancer: relationship to disease stage and hormone status. *Br J Cancer* 48: 689-696, 1983.
- Kennedy BP, Chan CC, Culp SA, Cromlish WA: Cloning and expression of rat prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)-2 cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 494-450, 1993.
- Kerins DM, Murray R, Fitzgerald FA: Prostacyclin and prostaglandin E1. Molecular mechanisms and therapeutic utility. *Prog Hemost Thromb* 10: 307-337, 1991.
- Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D, Knapp DW: Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol* 38: 116-119, 2001.
- Khan KN, Knapp DW, Denicola DB, Harris RK: Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am J Vet Res* 61: 478-481, 2000.

- Kimura M, Osumi S, Ogihara M: Stimulation of DNA synthesis and proliferation by prostaglandins in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 404: 259-271, 2000.
- Knapp DW, Richardson RC, Bottoms GD, Teclaw R, Chan TCK: Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 29: 214-218, 1992.
- Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tenabe T: Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxidase synthase 2. *Eur J Biochem* 221: 889-897, 1994.
- Kovacs G: Abnormalities of chromosome no. 1 in human solid malignant tumours. *Int J Cancer* 21:688-694, 1978.
- Krook L: A statistical investigation of carcinoma in the dog. *Acta Pathol Microbiol Scand* 35: 407, 1954.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR: TIS10, a phorbol ester tumor promotor-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthetase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266: 12866-12872, 1991.
- Kurzman ID, Gilbertson SR: Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg* 1: 25-32, 1986.

- Ledwith BJ, Pauley CJ, Wagner LK, Rokos CL, Alberts DW, Manam S: Induction of cyclooxygenase-2 expression by peroxisome proliferators and non-tetradecanoylphorbol 12,13-myristate-type tumor promoters in immortalized mouse liver cells. *J Biol Chem* 272: 3707-3714, 1997.
- Lee DW, Sung MW, Park SW, Seong WJ, Roh JL, Park B, Heo DS, Kim KH: Increased cyclooxygenase-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, 2002.
- Lee WH, Boyer TG: BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *Lancet* 358 Suppl: S5, 2001.
- Levine L: Arachidonic acid transformation and tumor production. *Adv Cancer Res* 35:49-79. 1981.
- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuck, JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK: Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell* 91: 197-208, 1997.
- Liu XH, Rose DP: Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56: 5125-5127, 1996.
- Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC: NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 58: 4245-4249, 1998.

- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, and Hla T: Overexpression of COX-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem*, 276: 18563-18569, 2001.
- Loll PJ, Picot D, Garavito RM: The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol* 2: 637-643, 1995.
- Loftin CD, Trivedi DB, Tiano HF, Clark JA, Lee CA, Epstein JA, Morham SG, Breyer MD, Nguyen M, Hawkins BM, Goulet JL, Smithies O, Koller BH, Langenbach R: Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1059-1064, 2001.
- Lu X, Xie W, Reed D, Bradshaw WS, Simmons DL: Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7961-7965, 1995.
- MacEwen EG, Patnaik AK, Harvey HJ, Panko WB: Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Res* 42: 2255-2259, 1982.
- Martin PM, Cotard M, Mialot JP, Andre F, Raynaud JP: Animal models for hormone-dependant human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles in canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemother Pharmacol* 12: 13-17, 1984.
- Marnett LJ: Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 52: 5575-5589, 1992.

- Masferrer JL, Leahy K, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K: Angiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 60: 1306-1311, 2000.
- Matsumoto T, Sagawa N, Yoshida M, Mori T, Tanaka I, Mukoyama M, Kotani M, Nakao K: The prostaglandin E2 and F2 alpha receptor genes are expressed in human myometrium and are down-regulated during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 238: 838-841, 1997.
- McEntee MF, Cates JM, Neilsen N: Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Vet Pathol* 39(4): 428-436, 2002.
- Mialot JP, André F, Martin PM, Cotard DM, Raynaud JP : Étude de récepteurs des hormones stéroïdes dans les tumeurs mammaires de la chienne II : corrélations avec quelques caractéristiques cliniques. *Recueil Médecine Vétérinaire* 158: 513-521, 1982.
- Miller TA: Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am J Physiol.* 245: G601-23, 1983.
- Misdorp W, Else RW, Hellmèn E, Lipscomb TP: Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Bulletin of the World Health Organization* 1-50, 1999.

- Mohammed SI, Coffman K, Glickman NW, Hayek MG, Waters DJ, Schlitter D, DeNicola DB, Knapp DW: Prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64: 1-4, 2001.
- Mohammed SI, Bennett PF, Craig BA, Glickman NW, Mutsaers AJ, Snyder PW, Widmer WR, DeGortari AE, Bonney PL, Knapp DW. Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Res* 62:356-8, 2002.
- Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL: Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthetase-1 and -2. *J Biol Chem* 270: 10902-10908, 1995.
- Morris JS, Dobson JM, Bostock DE, O'Farrell E: Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. *Vet Rec* 142: 656-658, 1998.
- Moulton JE: Tumors of the mammary gland in : *Tumors in domestic animals*. 4 th edn. Ed JE Moulton, Iowa State Press 575-606.
- Muto T, Wakui S, Takahashi H, Maekawa S, Masaoka T, Ushigome S, Furusato M: p53 gene mutation occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Vet Pathol* 37: 248-253, 2000.
- Neufang G, Furstenberger G, Heidt M, Marks F, Muller-Decker K: Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7629-7634, 2001.

- Nolan RD, Danilowicz RM, Eling TE: Role of arachidonic acid metabolism in the mitogenic response of BALB/c 3T3 fibroblasts to epidermal growth factor. *Mol Pharmacol* 33: 650-656, 1988.
- O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW: Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and -2 in human tissues. *FEBS Lett* 330: 156-160, 1993.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM: Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell* 87: 803-809, 1996.
- Otto JC, DeWitt DL, Smith WL: N-glycosylation of prostaglandin-endoperoxide synthetase-1 and-2 and their orientation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 268: 18234-18242, 1993.
- Otto JC, Smith WL: Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12: 139-156, 1995.
- Paganini-Hill A, Chao A, Ross RK, Henderson BE: Aspirin use and chronic diseases: a cohort study of the elderly. *BMJ* 299: 1247-1250, 1989.
- Park EJ, Pezzuto JM: Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 21: 231-255, 2002.
- Parrett ML, Harris RE, Joarder FS, Ross MS, Clausen KP, Robertson HI: Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer. *Int J Oncol* 10: 503-507, 1997.



- Parrett ML, Abou-Issa HM, Alshafie G, Ross MS, Harris RE, Robertson FM: Comparative ability of ibuprofen and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide to inhibit development of rat mammary adenocarcinomas associated with differential inhibition of gene expression of cyclooxygenase isoforms. *Anticancer Res* 19: 5079-5085, 1999.
- Pérez Alenza MD, Rutteman GR, Pena L, Beynen AC, Cuesta AP: Relation between habitual diet and canine mammary tumours in a case-control study. *J Vet Internal Med* 12: 132-139, 1998.
- Pestili de Almeida EM, Piché C, Sirois J, Doré M : Expression of COX-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *Journal of histochemistry and Cytochemistry* 49: 867-875, 2001.
- Prasit P, Wang Z, Brideau C, Chan CC, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans JF, Ford-Hutchinson AW, Gauthier JY, Gordon R, Guay J, Gresser M, Kargman S, Kennedy B, Leblanc Y, Leger S, Mancini J, O'Neill GP, Ouellet M, Percival MD, Perrier H, Riendeau D, Rodger I, Zamboni R, et al.: The discovery of rofecoxib, [MK 966, Vioxx<sup>®</sup>, 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone], an orally active cyclooxygenase-2-inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 9:1773-1778, 1999.
- Prescott SM, Fitzpatrick FA: Cyclooxygenase and carcinogenesis. *Biochimica and Biophysia Acta* 1470:M69-M78, 2000.
- Raynaud JP, Cotard M, Andre F, Mialot JP, Rolland PH, Martin PM: Spontaneous canine mammary tumors: A model for human endocrine therapy? *J Steroid Biochem* 15: 201-207, 1981.

- Reese DM, Slamon DJ: HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells* 15: 1-8, 1997.
- Ristimäki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M: Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 57: 1276-1280, 1997.
- Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J: Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 62: 632-5, 2002.
- Rolland PH, Martin PM, Jaquemier J, Rolland AM, Toga M: Prostaglandin in human breast cancer: evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *J Nat Cancer Inst* 64: 1061-1070, 1980.
- Rutteman GR, Misdorp W, Blankenstein NMA, Ven Den Brom WE: Oestrogen and progesterin receptors in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Breast Cancer* 58: 594-599, 1988.
- Sartin EA, Barnes S, Kwapien R, Wolfe LG: Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in the dog. *J Vet Res* 53: 2196-2200, 1992.
- Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kumura S, Kato H, Kondo M, Hla T: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55: 3785-3789, 1995.

- Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, Hori M: Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo 79: 1469-1477, 1999.
- Schafer AI: Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. J Clin Pharmacol 35: 209-219, 1995.
- Schneider R, Dorn CR, Taylor DON: Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. J Natl Cancer Inst 43: 1249-1261, 1969.
- Schreinemachers DM, Everson RB: Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. Epidemiology 5: 138-146, 1994.
- Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P: Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implication for tumor necrosis- $\alpha$  apoptotic signaling. J Biol Chem 276: 12035-12040, 2001.
- Sharpe CR, Collet JP, McNutt M, Belzile E, Boivin JF, Hanley JA: Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage. Brit J Cancer 83: 112-120, 2000.
- Shaw G, Kamen R: A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. Cell 46: 659-667, 1986.

- Sheng GG, Shao J, Sheng H, Hooton EB, Isakson PC, Morrow JD, Coffey RJ Jr, DuBois RN, Beauchamp RD: A selective cyclooxygenase 2 inhibitor suppresses the growth of H-ras-transformed rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 113: 1883-1891, 1997.
- Sheng H, William CS, Liang P, DuBois RN, Beauchamp RD: Induction of the cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblast and the role of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 273: 22120-22127, 1998.
- Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN: Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 276: 18075-18081, 2001.
- Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL: Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1178-1182, 1989.
- Simmons DL, Botting RM, Robertson PM, Madsen ML, Vane JR: Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3275-3280, 1999
- Singletary ES, Bevers T, Dempsy P, Farrar WB, Garber J, Harris RE, Helvie M, Jacobs M, Pass H, Patterson-Smith ML, Taranto S, Vanta LA: Screening for and evaluation of suspicious breast lesions. *Oncology* 12: 89-138, 1998.

- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al.: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-712, 1989.
- Sonnenschien EG, Glickman LT, Goldschmidth MH, McKee LJ: Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *American Journal of Epidemiology* 133:694-703, 1991.
- Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, Oshima M, Taketo MM: Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc (Delta 716) knockout mice. *Nat Med* 7: 1048-1051, 2001.
- Soslow RA, Danneberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT: COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 89: 2637-2645, 2000.
- Stephen M, Perscott FA, Fitzpatrick FA: Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1470: M69-78, 2000.
- Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ: Transcription of COX-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cell. *Cancer Res* 56: 4424-4429, 1996.
- Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ: Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 201-210, 1997.

- Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ: Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 273: 21875–21882, 1998.
- Subbaramaiah K, Dannenberg A: Inducible microsomal prostaglandin E synthase is overexpressed in colorectal adenomas and cancer. *Clin Cancer Res* 7: 3971-3976, 2001.
- Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* 277: 18649-18657, 2002.
- Sullivan A, Yuille M, Repellin C, Reddy A, Reelfs O, Bell A, Dunne B, Gusterson BA, Osin P, Farrell PJ, Yulug I, Evans A, Ozcelik T, Gasco M, Crook T: Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. *Oncogene* 21(9): 1316-1324, 2002.
- Tan WC, Privett OS, Goldyne ME: Studies of prostaglandins in rat mammary tumors induced by 7,12-dimethyl-benz(a)anthracene. *Cancer Res* 34: 3229-3231, 1974.
- Taketo MM: Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 90: 1529-1536, 1998.
- Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr: Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 325: 1593-1596, 1991.

- Tremblay C, Doré M, Bochsler PN, Sirois J: Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 91: 1398-1403, 1999.
- Tsujii M, DuBois RN: Alteration in the cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83: 493-501, 1995.
- Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-716, 1998.
- Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ: Cyclooxygenase expression is upregulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 59: 987-989, 1999.
- Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N: Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. *L Surg Oncol* 69: 168-172, 1998.
- Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61(2): 203-212, 1990.
- Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Bio* 231: 232-235, 1971.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA: Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(6): 2046-2050, 1994.

- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM: Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 38: 97-120, 1998.
- van der Kooy K, Rookus MA, Peterse HL, van Leeuwen FE: p53 protein overexpression in relation to risk factors for breast cancer. *Am J Epidemiol* 144: 924-933, 1996.
- von Euler US: On the specific vas-dilating substances from accessory glands in human and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol* 88: 213-234, 1936.
- von Euler US: History and development of prostaglandins. *Gen Pharmacol* 14: 3-6, 1983.
- Wennogle LP, Liang H, Quintavalla JC, Bowen BR, Wasvary J, Miller DB, Allentoff A, Boyer W, Kelly M, Marshall P: Comparison of recombinant cyclooxygenase-2 to native isoforms: aspirin labeling of the active site. *FEBS Letter* 371: 315-320, 1995.
- Williams CS, DuBois RN: Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am J Physiol* 270: G393-400, 1996.
- Williams CS, Mann M, DuBois RN: The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 18: 7908-7916, 1999.
- Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ: Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res* 58: 2929-2934, 1998.



- Wolfe LG, Smith BB, Tolvio-Kinnucan MA, Sartin EA, Kwapien RP, Henderson RA, Barnes S: Biologic properties of cells line derived from canine mammary carcinomas. *JNCI* 77: 783-789, 1986.
- Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimaki A: Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 58: 4997-5001, 1998.
- Wooster R, Weber BL: Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* 348: 2339-2334, 2003.
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL: Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthetase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2692-2696, 1991.
- Xie WL, Herschman HR: v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. *J Biol Chem* 270: 27622-27628, 1995.
- Yuan CJ, Mandal AK, Zhang Z, Mukherjee AB: Transcriptional regulation of Cyclooxygenase-2 gene expression: novel effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 60: 1084-1091, 2000.



# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant <b>MELANIE BRUNELLE</b>		Code permanent
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option <b>PATHOLOGIE</b>

## DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Titre <b>Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumor-Derived Cells</b>	
Auteurs <b>M. Brunelle, E.A. Sartin, L.G. Wolfe, J. Sirois, M. Doré</b>	
Revue	Date de publication

## DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord et j'autorise et je l'autorise à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre</i> <b>Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumor-derived cells</b>		
Coauteur <b>MONIQUE DORÉ</b>	Signature 	Date <b>31/7/03</b>
Coauteur <b>JEAN SIROIS</b>	Sig	Date <b>31/7/03</b>
Coauteur <b>E.A. SARTIN</b>	Sig	Date <b>09/09/03</b>
Coauteur <b>L.G. WOLFE</b>	Sig	Date <b>09/09/03</b>
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

Envoyé à la FÉS le **10 nov. 2003**

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