

2m11.2930.4

Université de Montréal

Caractérisation moléculaire de la prostaglandine G/H synthétase canine et
régulation dans les cellules de l'adénocarcinome prostatique *in vitro*

par

Djamila Boutemmine

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en biologie moléculaire

Août, 2001

© Djamila Boutemmine, 2001



QH

506

U54

2002

v.004

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation moléculaire de la prostaglandine G/H synthétase canine et
régulation dans les cellules de l'adénocarcinome prostatique *in vitro*

Présenté par :

Djamila Boutemmine

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président du jury : Dr. Jacques Lussier

Directeur de recherche : Dr. Jean Sirois

Co-directrice de recherche : Dr. Monique Doré

Membre du jury : Dr. Simone Chevalier

SOMMAIRE

La prostaglandine G/H synthétase-2 (PGHS-2) appelée également cyclooxygénase-2 (ou COX-2) est l'enzyme-clé qui catalyse la première étape limitante dans la voie de la biosynthèse des prostaglandines. La PGHS-2 est surexprimée dans les cancers humains et expérimentaux et dans les lignées cellulaires cancéreuses et transformées qui accumulent en même temps des niveaux élevés de la prostaglandine E₂ (PGE₂). La PGHS-2 est induite dans les adénocarcinomes prostatiques humain et canin *in vivo*. La PGHS-2 et la PGE₂ ont été impliquées dans le développement et la progression du cancer de la prostate chez l'homme et chez le chien. Les objectifs spécifiques de cette étude étaient de cloner et caractériser la PGHS-2 canine et d'étudier sa régulation *in vitro* dans la lignée cellulaire épithéliale cancéreuse CPA 1 provenant d'un adénocarcinome prostatique spontané canin. L'ADN complémentaire (ADNc) de la PGHS-2 canine a été cloné par criblage d'une librairie d'expression préparée à partir de la rate d'un chien en utilisant comme sonde un fragment de l'ADNc de la PGHS-2 de souris et par l'amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc. Les résultats du séquençage ont révélé un cadre de lecture ouvert de 1815 paires de bases codant pour une protéine de 604 acides aminés qui est identique à plus de 88% aux autres orthologues caractérisés des mammifères. La région 3' non traduite comporte 1655 paires de bases et contient 10 répétitions de la séquence de Shaw-Kamen (ATTTA), un motif qui confère l'instabilité aux ARN messagers (ARNm). La régulation de la protéine PGHS-2 et de la synthèse de

la PGE₂ a été étudiée dans les cellules CPA 1 cultivées en absence ou en présence de doses croissantes de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), de facteur de nécrose tissulaire- α (TNF- α) et de lipopolysaccharide (LPS). Les résultats des analyses par immunobuvardage immunocytochimiques et des dosages radioimmunologiques ont montré que la protéine PGHS-2 et la PGE₂ étaient présentes à de faibles concentrations dans les cellules contrôles. Leurs concentrations ont augmenté après stimulation par les agents utilisés, le PMA (10 μ g/ml) étant l'inducteur le plus puissant. Les résultats des analyses par buvardage Northern ont aussi révélé une augmentation de l'ARNm de la PGHS-2 par le PMA, le TNF- α et le LPS. L'induction de l'ARNm de la PGHS-2 par ces agents n'était pas dépendante d'une nouvelle synthèse des protéines (co-incubation avec la cycloheximide; 10 μ g/ml) mais était bloquée par un inhibiteur de la transcription, l'actinomycine D (5 μ g/ml).

En conclusion, cette étude a permis de caractériser la structure de la PGHS-2 canine et d'établir un modèle *in vitro* pour élucider les bases moléculaires de l'expression de la PGHS-2 dans l'adénocarcinome prostatique.

2.2.1.7 Inhibition de la PGHS-1 et de la PGHS-2 par les anti-inflammatoires non stéroïdiens	17
2.2.2 Structure des gènes de la PGHS-1 et de la PGHS-2 et régulation de l'expression de la PGHS-2	19
2.2.2.1 Structure des gènes de la PGHS-1 et de la PGHS-2	19
2.2.2.2 Régulation de l'expression de la PGHS-2	21
2.2.3 Fonctions de la PGHS-2	22
2.2.3.1 Fonctions physiologiques de la PGHS-2	22
2.2.3.2 Rôle de la PGHS-2 dans l'inflammation	23
2.2.3.3 Rôle de la PGHS-2 dans la carcinogénèse	23
2.3 L'adénocarcinome prostatique	26
2.3.1 Structure de la prostate	26
2.3.1.1 Morphologie-anatomie	26
2.3.1.2 L'épithélium	28
2.3.1.3 Le stroma	30
2.3.1.4 Le liquide prostatique	30
2.3.2 Physiologie: aspects endocrines	31
2.3.3 L'adénocarcinome prostatique canin	33
2.3.4 La néoplasie prostatique intraépithéliale	36
2.3.5 Altérations moléculaires dans le cancer de la prostate	37
2.3.5.1 Altérations génétiques	38
2.3.5.2 Altérations du récepteur des androgènes	38
2.3.5.3 Altérations du métabolisme de l'acide arachidonique	42

2.3.5.4 Induction de la PGHS-2 dans le cancer de la prostate	44
2.3.6 Etiologies de l'adénocarcinome prostatique	46
2.3.7 Les modèles pour l'étude de l'adénocarcinome prostatique ..	47
3. HYPOTHÈSE et OBJECTIFS	49
3.1 Hypothèse	49
3.2 Objectifs	49
4. ARTICLE : Molecular Characterization of canine Prostaglandin G/H Synthase-2 and Regulation in Prostatic Adenocarcinoma Cells <i>In vitro</i>	50
5. DISCUSSION	98
6. CONCLUSION	109
7. BIBLIOGRAPHIE	110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Voies de signalisation, facteurs de transcription et éléments de réponse impliqués dans l'induction de la PGHS-2	102
--	-----

LISTE DES FIGURES

2. RECENSION DE LA LITTERATURE

Figure 1: Structure de l'acide arachidonique avec numérotation des atomes de carbone	6
Figure 2: Voie de la biosynthèse des prostaglandines	8
Figure 3: Comparaison schématique des structures des ADNc et des protéines PGHS-1 et PGHS-2 de souris.....	14
Figure 4: Schéma de la structure dimérique de la PGHS-1 ovine cristallisée	16
Figure 5: Structure de quelques anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), non sélectifs (flurbiprofène et ibuprofène) et sélectifs (célécoxib et rofécoxib)	18
Figure 6: (A) Comparaison schématique de la structure exon-intron des gènes PGHS-1 (PES-1) et PGHS-2 (PES-2) humains. (B) Schéma de la région promotrice du gène PGHS-2 (PES-2) humain	20
Figure 7: Effet de l'inactivation du gène PGHS-2 (Ptgs2) sur le nombre de polypes chez les souris dont le gène Apc est muté.....	25
Figure 8: Représentation schématique de la régulation de la croissance prostatique	32

Figure 9: Représentation schématique de la double face de l'action des androgènes dans la prostate.....	41
Figure 10: Schéma montrant les effets des facteurs de croissance sur les cellules épithéliales et stromales de la prostate normale.....	42
Figure 11 : Mécanismes impliqués dans l'induction de la PGHS-2	108
4. ARTICLE	
Figure 1 : Dose-dependent induction of PGHS-2 protein and PGE2 synthesis by PMA, TNF- α and LPS in CPA cells	82
Figure 2 : Time-dependent induction of PGHS-2 protein and PGE2 synthesis by PMA, TNF- α and LPS in CPA cells	84
Figure 3 : Immunocytochemical detection of PGHS-2 in CPA cells	86
Figure 4 : Nucleotide sequence of the canine PGHS-2 cDNA	88
Figure 5 : Predicted amino acid sequence of canine PGHS-2 and comparison with the human homolog	90
Figure 6 : Dose-dependent induction of PGHS-2 mRNA by PMA, TNF- α and LPS in CPA cells	92
Figure 7 : Time-dependent induction of PGHS-2 mRNA by PMA, TNF- α and LPS in CPA cells	94
Figure 8 : Effect of transcriptional and translational inhibitors on agonist- dependent induction of PGHS-2 in CPA cells	96

ABRÉVIATIONS

- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire
- AINS: anti-inflammatoire non-stéroïdien
- AMP: adénosine monophosphate
- AP-1 : Activation Protein-1
- APC : Adenomatous Polyposis Coli
- ARN: acide ribonucléique
- ARNm: acide ribonucléique messenger
- boite E: séquence CACGTG de liaison de c-Myc
- BRCA 1 : Breast Cancer susceptibility gene 1
- C/EBP : CCAAT Enhancer Binding Protein
- coll: collègues
- COX: cyclooxygénase
- cPLA₂ : cytosolic Phospholipase A₂
- CRE : cAMP Response Element
- CRRA: Centre de Recherche en Reproduction Animale
- DAG : diacylglycérol
- DHT: Dihydrotestostérone
- DP: récepteur pour la PGD₂
- EGF: Epidermal growth factor
- EP: récepteur pour la PGE₂

ERK : Extra signals Regulated Kinase

FP: récepteur pour la $\text{PGF}_{2\alpha}$

FSH: Follicle-Stimulating Hormone

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone

HGPIN: High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia

IGBP: Insulin Growth Factor Binding Protein

IGF: Insulin Growth Factor

IL: Interleukine

IP: récepteur pour la PGI_2

IP_3 : Inositol triphosphate

JNK : Jun N-terminal Kinase

KGF : Keratinocyte Growth Factor

kb: kilobase

kDa: kilodalton

LH: Luteinizing Hormone

LPS: Lipopolysaccharide

LOH: Loss Of Heterozygosity

MAPK: Mitogen Activated- Proline-directed Kinase

$\text{NF-}\kappa\text{B}$: Nuclear Factor for κB

NF-IL6: Nuclear Factor for IL-6

ng: nanogramme

PAP: phosphatase acide prostatique

p53: protéine 53

pb: paire de bases

pg: picogramme

PG: Prostaglandine

PGHS: Prostaglandine G/H Synthétase

PIN: Prostatic Intraepithelial Neoplasia

PI3K: phosphatidylinositol 3 phosphate kinase

PKC : protéine kinase C

PLA₂: phospholipase A₂

PLC: phospholipase C

PMA: Phorbol 12-Myristate 13- Acetate

PPAR: Peroxysome Proliferators-Activated Receptor

PSA : Prostate Specific Antigen

PTK: protéine tyrosine kinase

PTEN: Phosphatase and Tensin homologue

Rb: Retinoblastoma

sPLA₂: secretory phospholipase A₂

TP: récepteur pour le TXA₂

TGF : Transforming Growth Factor

TXA₂: thromboxane A₂

µg: microgramme

µl: microlitre

REMERCIEMENTS

C'est pour moi un devoir agréable de remercier le Dr. Jean Sirois, professeur au Département de biomédecine vétérinaire de l'Université de Montréal, qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui, par ses orientations, sa disponibilité et sa gentillesse, m'a permis de mener ce travail à son terme.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont aussi :

- à la Dre Monique Doré, professeure au Département de pathologie et de microbiologie, co-directrice de mon projet de maîtrise, pour son suivi et ses remarques.
- au Dr Alan K. Goff et au Dr Helen E. Jones pour leur collaboration.
- au Dr Derek Boerboom pour ses conseils et son implication.
- à Nadine Bouchard pour son aide, son amabilité et son assistance lors des manipulations.
- aux organismes qui ont subventionné cette étude : la Morris Animal Foundation et l'Institut de Recherche en Santé du Canada.

Je ne saurais clore ces lignes sans remercier Micheline Sicotte, Hélène Boucher-Rhéaume, Micheline Saint-Germain et Odette Hélié pour leur accueil toujours chaleureux et leur aide durant mes études .

1. Introduction

L' adénocarcinome prostatique est le cancer le plus fréquent et la deuxième cause de mortalité par cancer dans la population mâle des pays occidentaux (Dennis, 2000). Aux États-Unis, où son incidence est la plus élevée au monde, 198 100 nouveaux cas sont anticipés pour l'année 2001 (Greenlee et coll. 2001). En dépit des efforts immenses pour améliorer le diagnostic et le traitement de la maladie, l'incidence, la mortalité et la morbidité associées à ce cancer n'ont pas diminué depuis les 25 dernières années car la maladie métastatique est incurable. Le besoin de nouvelles stratégies de contrôle de ce cancer est urgent (Hong et coll., 1997). La chimioprévention, basée sur la connaissance des mécanismes de la carcinogénèse prostatique et qui a montré son efficacité chez les animaux d'expérience (Oshima et coll., 2001), constitue une approche prometteuse (Hong et coll., 1997) qui requiert, néanmoins, le développement de modèles prédictifs. Plusieurs modèles animaux sont utilisés dans les études de la carcinogénèse prostatique, incluant les adénocarcinomes spontanés et induits chez le rat et les modèles de reconstitution et transgéniques chez la souris (Russell, 1998 ; Navone et coll., 1999). Cependant, à l'exclusion de l'homme, le chien est la seule espèce animale domestique à développer spontanément le cancer de la prostate (Waters et coll., 1997). De plus, plusieurs aspects de la maladie sont communs au chien et à l'homme : le cancer de la prostate est diagnostiqué à un âge avancé, il présente la lésion précancéreuse HGPIN, il est insidieux, invasif et hautement malin, il a une prédilection pour les métastases osseuses, sa progression comporte plusieurs

stades et grades (von Eschenback ,1996) et des anomalies moléculaires similaires (Allard et coll., 1997 ; 2000), la croissance tumorale est dépendante des androgènes dans les stades précoces et elle évolue invariablement, dans le cancer avancé, vers un état dit androgéno-indépendant qui est réfractaire à toutes thérapies et qui est léthal (Waters et coll., 1997 ; Bruckheimer et coll., 1999). Les facteurs de risque de ce cancer chez le chien ne sont pas connus mais chez l'homme ils incluent l'âge, le facteur familial, la race et les facteurs environnementaux (Ross et coll., 1998). Ces derniers, notamment les graisses alimentaires, pourraient être un facteur de risque commun à l'homme et au chien (Kolonel et coll., 1999). Le chien constitue par conséquent un modèle intéressant pour les études sur le cancer de la prostate notamment pour l'expérimentation de nouvelles thérapies anti-cancer et d'agents chimiopréventifs (Waters et coll., 1997). Ce n'est que récemment que la présence de la PGHS-2 a été démontrée dans le cancer de la prostate alors que des concentrations de la PGE₂ de dix fois plus élevées avaient déjà été observées dans le tissu prostatique tumoral comparé au tissu prostatique normal. La PGHS, appelée également cyclooxygénase (ou COX), est l'enzyme-clé qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ (PGH₂), le précurseur commun pour la synthèse de toutes les prostaglandines. Deux isoformes de la PGHS, la PGHS-1 et la PGHS-2, catalysent la synthèse des prostaglandines dans les cellules des mammifères. Les deux enzymes ont des structures similaires mais diffèrent dans leur patron d'expression. La PGHS-1 est présente dans la plupart des tissus et elle est considérée comme l'isoforme constitutive, alors que la PGHS-2 est généralement indétectable dans

la plupart des tissus mais peut être induite par une variété d'agents stimulants et elle est considérée comme l'isoforme inductible (Smith et coll., 1996). Les deux enzymes sont les cibles des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) non sélectifs tels l'aspirine et l'indométhacine. La PGHS-2, quant à elle, est la cible préférentielle des AINS dits sélectifs nouvellement développés tels le célécoxib et le rofécoxib (Dewitt et coll., 1999). Une expression augmentée de la PGHS-2, mais non de la PGHS-1, a été associée à de nombreux cancers humains et expérimentaux (Eberhart et coll., 1994 ; Denkert et coll., 2001). Une relation de cause à effet entre l'expression de la PGHS-2 et le cancer a été confirmée dans les modèles animaux de polypose adénomateuse familiale dans lesquels l'inactivation de la PGHS-2 cause une réduction dramatique du nombre des polypes intestinaux (Oshima et coll., 1996). Le même résultat est obtenu quand ces souris sont traitées avec un AINS sélectif (Oshima et coll., 2001). La première étude montrant l'induction de la PGHS-2 dans le cancer de la prostate a été faite chez le chien (Tremblay et coll., 1999). Des études récentes ont rapporté sa présence également dans le cancer de la prostate humaine (Gupta et coll., 2000 ; Uotila et coll., 2001). L'importance des prostaglandines dans le cancer de la prostate a été soulignée par le fait que le tissu prostatique tumoral forme dix fois plus de PGE_2 comparé au tissu normal (Chaudry et coll., 1994), que la PGE_2 stimule la croissance des cellules prostatiques tumorales *in vitro* et que les AINS inhibent la croissance (Tjandrawinata et coll., 1997 ; Attiga et coll., 2000) et induisent l'apoptose (Liu et coll., 1998 ; Goluboff et coll., 1999) des cellules prostatiques cancéreuses. La PGHS-2 et la PGE_2 seraient impliquées dans les différents stades du processus de la carcinogénèse. Ainsi, la PGE_2

exercerait des effets promoteurs de tumeurs en stimulant la croissance des cellules tumorales, l'angiogénèse, les propriétés invasives et métastatiques, l'immunosuppression et la résistance à l'apoptose (Dannenber, 1999). Dans le cancer de la prostate, la PGE₂ médierait en plus les effets carcinogènes des graisses alimentaires et des hormones (Badawi, 2000). La PGHS-2 elle-même, par son activité peroxydase, convertirait de nombreux procarcinogènes en carcinogènes génotoxiques qui causeraient des mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes, contribuant à l'initiation et à la progression du cancer (Subbaramaiah et coll., 1997 ; Sugimura, 2000 ; Wiese et coll., 2001 ; Nikolic et coll., 2001). Les AINS exerceraient leurs effets anti-tumoraux en inhibant l'activité et/ou l'expression de la PGHS-2 (Liu et coll., 1998 ; Xu et coll., 1999 ; Hsu et coll., 2000). Certains AINS agissent néanmoins par des mécanismes indépendants de la PGHS-2 et de la synthèse des prostaglandines (Myers et coll., 2001). Les AINS sélectifs pourraient donc être utilisés comme agents chimiopréventifs et thérapeutiques du cancer de la prostate (Hong et coll., 1999). Cependant, en dépit de l'élucidation du rôle de la PGHS-2 et de la synthèse des prostaglandines dans le cancer de la prostate, le contrôle moléculaire de l'expression de cette enzyme dans ce cancer demeure peu étudié.

2. Recension de la littérature

2.1 Les prostaglandines

Les prostaglandines sont un groupe d'acides gras cycliques oxygénés dérivés des acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbone (O'Banion, 1999). Ces molécules lipidiques, appartenant à la grande famille des eicosanoïdes, sont des médiateurs extracellulaires et intracellulaires impliqués dans de nombreux processus tant physiologiques (reproduction, hémostasie, neuromodulation) que pathologiques (inflammation, cancer) (Dubois et coll., 1998). Elles sont synthétisées par tous les animaux y compris les coraux (Koljak et coll., 2001). Leur importance est soulignée par leur conservation dans l'évolution puisque la signalisation par ces molécules est retrouvée dans les levures et les plantes (Versteeg et coll., 1999).

2.1.1 Structure et synthèse des prostaglandines

Les prostaglandines les plus abondamment formées dans les cellules des mammifères sont les prostaglandines du groupe 2 dérivées de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé à 20 atomes de carbone (Figure 1). Il est le constituant le plus abondant des phospholipides membranaires dans lesquels il est estérifié en position 2.

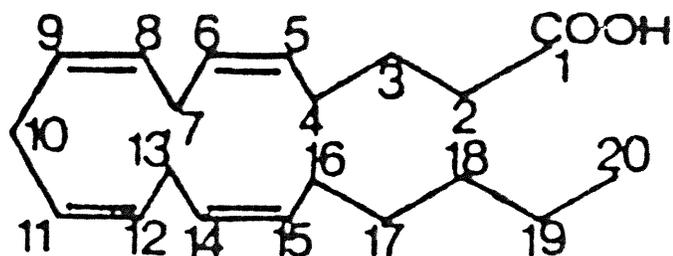


Figure 1. Structure de l'acide arachidonique avec numérotation des atomes de carbone.

La structure des prostaglandines (Figure 2) dérive de celle de l'acide arachidonique avec un squelette à 20 atomes de carbone contenant un noyau cyclopentane auquel sont attachées deux chaînes aliphatiques latérales contenant deux doubles liaisons (5 cis et 13 trans) et un groupe hydroxyl sur le carbone 15. Les prostaglandines sont classées en types allant de A à J. Les prostaglandines D₂ (PGD₂), E₂ (PGE₂), F_{2α} (PGF_{2α}), I₂ (PGI₂) et J₂ (PGJ₂), et la thromboxane A₂ (TXA₂) constituent les prostaglandines majeures biologiquement actives formées par les cellules des mammifères (Smith et coll., 1989). La figure 2 illustre les trois étapes de la synthèse des prostaglandines : 1) la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires ; 2) la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine G₂ (PGG₂) ; 3) la conversion de la PGG₂ en prostaglandine H₂ (PGH₂). La synthèse des

mitogène, d'une cytokine ou d'un facteur de croissance avec son récepteur) ou non spécifique (lumière, chaleur, stress mécanique sur la cellule) déclenche l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) (Smith et coll., 1989 ; 1992). La PLA₂ activée hydrolyse alors spécifiquement la liaison ester liant l'acide arachidonique aux phospholipides membranaires (Smith et coll., 1992). Une PLA₂ cytosolique (cPLA₂) et une PLA₂ sécrétoire (sPLA₂) catalysent la libération de l'acide arachidonique (Dennis et coll., 2000). L'acide arachidonique libre constitue le substrat de la prostaglandine G/H synthétase ou cyclooxygénase. Cette enzyme possède deux activités : une activité bioxygénase ou cyclooxygénase qui incorpore deux molécules d'oxygène sur l'acide arachidonique et le cyclise, le convertissant en endoperoxyde PGG₂ et une activité peroxydase qui réduit la PGG₂ en PGH₂ (Smith, 1989 ; 1992). La PGH₂ est ensuite convertie en prostaglandines par des synthétases spécifiques (Figure 2). Chez les mammifères, la plupart des cellules qui synthétisent les prostaglandines en produisent un seul type à cause de la prédominance d'une seule synthétase métabolisant la PGH₂ (Smith et coll., 1989 ; Sigal, 1991). Une fois synthétisées, les prostaglandines ne sont pas accumulées ; elles sont immédiatement libérées dans le milieu extracellulaire où elles vont agir localement, de façon autocrine, sur la cellule parentale et/ou paracrine sur les cellules voisines. Les réponses biologiques induites sont étroitement liées aux changements dans les concentrations des messagers secondaires intracellulaires tels que l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), le Ca²⁺, l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) (Smith et coll., 1992).

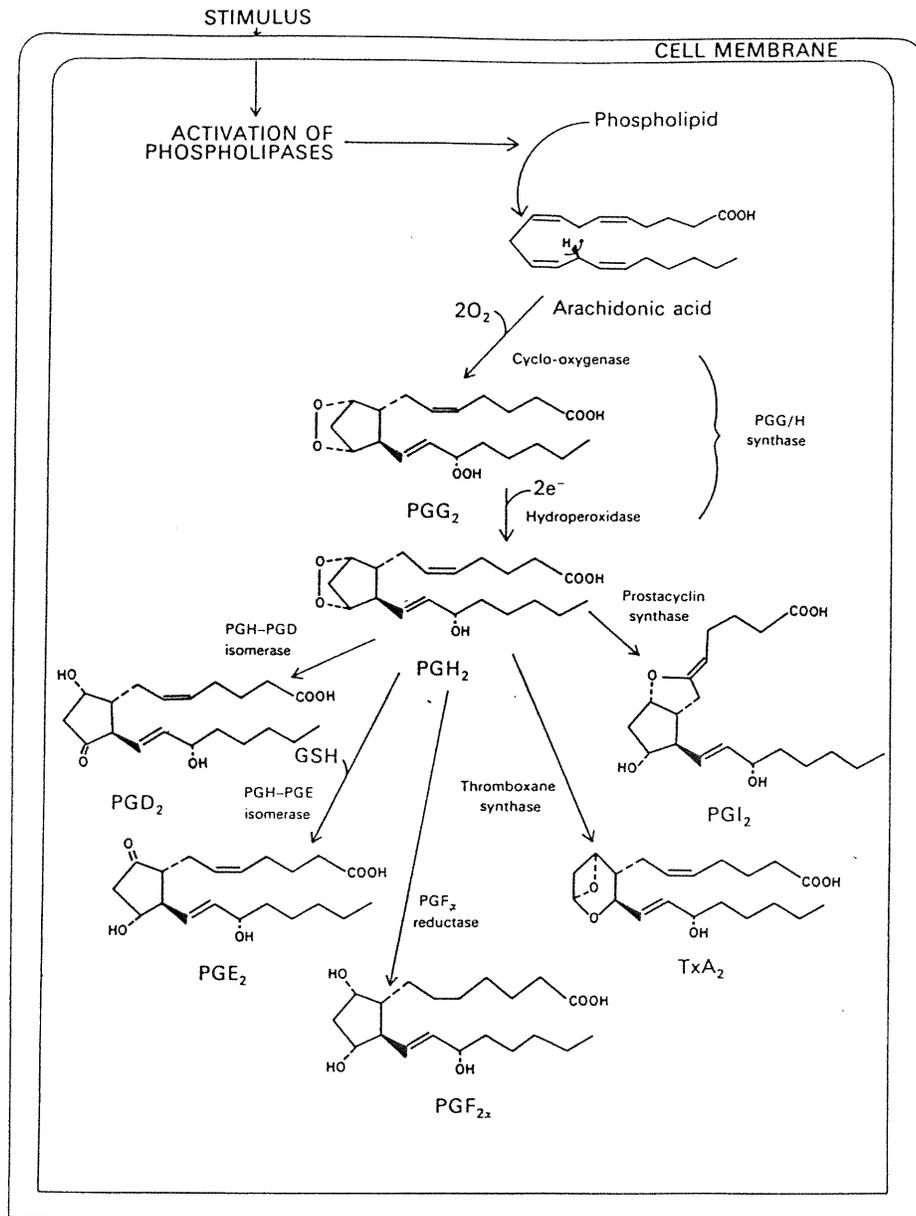


Figure 2. Voie de la biosynthèse des prostaglandines. PG (prostaglandine), PGI₂ (prostacycline), TXA₂ (thromboxane A₂). La TXA₂ a un noyau oxane (d'après Smith et coll., 1989).

2.1.2 Fonctions des prostaglandines

Chaque prostaglandine possède un profil d'actions dépendant du type de la cellule cible. Ces actions sont médiées *via* des récepteurs membranaires spécifiques couplés aux protéines G (Narumiya et coll., 1999). Cinq types de récepteurs des prostaglandines appelés EP, DP, IP, TP et FP et quatre sous-types du récepteur EP (EP₁ à EP₄) ont été identifiés dont plusieurs ont été clonés et caractérisés (Narumiya et coll., 1999). *Via* ces récepteurs, les prostaglandines exercent des effets puissants sur : 1) le muscle lisse : contraction (TXA₂, PGF_{2α}) et relaxation (PGE₂, PGI₂, PGD₂) ; 2) les vaisseaux sanguins : vasodilatation (PGE₂, PGD₂, PGI₂) et vasoconstriction (PGF_{2α}, TXA₂) ; 3) l'agrégation des plaquettes sanguines : stimulation (TXA₂ et PGF_{2α}) et inhibition (PGE₂, PGI₂, PGD₂) (Sigal et coll., 1991). Par ces effets, les prostaglandines contrôlent de nombreux processus physiologiques, incluant la reproduction, l'hémostase, les homéostasies vasculaire, rénale et gastro-intestinale et l'inflammation. Dans le cerveau, les prostaglandines sont impliquées dans l'induction du sommeil (PGD₂) et de la fièvre (PGE₂) et dans la perception de la douleur (PGE₂, PGI₂) et elles ont aussi des rôles neuromodulateurs et neuroendocriniens. Enfin, les prostaglandines, *via* leurs récepteurs, jouent à la fois le rôle de facteurs de croissance et de seconds messagers et sont impliquées dans l'inflammation aiguë et chronique et dans la carcinogénèse (Dubois et coll., 1998). L'acide arachidonique est aussi métabolisé en d'autres eicosanoïdes par les voies des lipoxgénases (Samuelsson, 1987 ; 2000) et de l'époxygénase (Capdevilla et coll., 1992).

2.2 La prostaglandine G/H synthétase

La prostaglandine G/H synthétase (PGHS), appelée également cyclooxygénase (COX), est l'enzyme centrale dans la voie de la biosynthèse des prostaglandines, catalysant la première étape limitante qui est la conversion de l'acide arachidonique en PGH_2 (Dewitt et coll., 1991). Il y a deux isoformes de la PGHS appelées PGHS-1 (ou COX-1) et PGHS-2 (ou COX-2). Les deux protéines sont les produits de deux gènes distincts. Elles catalysent la même réaction, ont des structures et des propriétés catalytiques similaires mais diffèrent au niveau de leur expression et fonctions (Smith et coll., 1996).

2.2.1 Structure de la PGHS

2.2.1.1 Clonage et caractérisation de la PGHS-1

La PGHS-1 a été purifiée par Miyamoto (1976) et van der Ouderaa (1977) à partir de vésicules séminales ovines et bovines respectivement, dans lesquelles elle se trouve naturellement à des concentrations élevées. Sa caractérisation biochimique a révélé une structure homodimérique ayant une masse moléculaire de 70 kilodaltons (kDa) et comportant des sucres. La protéine est intégrée dans la membrane du réticulum endoplasmique. L'ADN complémentaire (ADNc) de la PGHS-1 ovine a été cloné en 1988 (Dewitt et coll., 1988) en utilisant la séquence de la protéine. Les ADNc de la PGHS-1 murine (Yokoyama et coll., 1988 ; Dewitt et coll., 1990), humaine (Funk et coll., 1991) et du rat (Feng et coll., 1993) ont ensuite été clonés en utilisant la

séquence de l'ADNc de la PGHS-1 ovine. Enfin, les gènes codant pour la PGHS-1 humaine (Yokoyama et coll., 1989), murine (Kraemer et coll., 1992) et du rat ont été clonés à leur tour. Pendant vingt ans, la PGHS-1 fut la seule isoforme connue et appelée PGHS. On pensait que l'activation de la phospholipase était l'étape limitante dans la synthèse des prostaglandines en réponse à la stimulation cellulaire par les mitogènes, les hormones et les lipopolysaccharides (LPS). Cependant, des évidences expérimentales avaient vite suggéré l'existence d'une deuxième isoforme (Hershmann, 1996).

2.2.1.2 Les évidences de l'existence de la PGHS-2

Dès 1980, on avait observé que les concentrations des prostaglandines étaient toujours rapidement et fortement augmentées par l'inflammation et par la stimulation cellulaire (O'Banion, 1999). Cependant, les expériences d'hybridation avec l'ADNc de la PGHS-1 ne montraient pas de changements dans les concentrations de l'ARN messenger (ARNm) de l'enzyme (O'Banion, 1999). Puis, des études de l'effet des glucocorticoïdes sur l'induction de l'activité de la PGHS par l'oncogène Src, les cytokines et les LPS dans les fibroblastes, les monocytes et les macrophages ont vite conduit à l'hypothèse que deux pools de PGHS existaient dans les cellules : un pool constitutif dont les concentrations ne sont pas influencées par les glucocorticoïdes et les inducteurs et un pool contrôlé positivement par les inducteurs et négativement par les glucocorticoïdes (Hershmann, 1996 ; O'Banion, 1999). L'existence de la deuxième isoforme fut démontrée biochimiquement par Richards et Wong

(1990) dans les cellules de la granulosa d'ovaires de rat stimulées par l'hormone gonadotrope LH et par HAN et coll. (1990) dans les fibroblastes murins stimulés par Src ainsi que par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). La deuxième isoforme se présentait sous forme d'un doublet de masse moléculaire 72/74 kDa. Son existence fut confirmée par son clonage moléculaire (Xie et coll., 1991) et sa purification (Sirois et coll., 1992).

2.2.1.3 Clonage de la PGHS-2

L'ADNc de la PGHS-2 a été découvert en 1991 par Xie et coll. (1991) et Kujubu et coll. (1991) à partir de bibliothèques d'expression aviaire et murine issues de fibroblastes embryonnaires stimulés respectivement par l'oncogène Src et par le PMA, dans le but d'identifier les gènes précoces immédiats induits. Deux ADNc, respectivement le CEF147 et le TIS10, présentaient une homologie de séquence de 60% avec les PGHS-1 murine, ovine et humaine. L'ADNc de la PGHS-2 murine fut ensuite cloné (Kujubu et coll., 1991 ; O'Banion et coll., 1991). La protéine PGHS-2 du rat fut purifiée par Sirois et coll. (1992), puis les ADNc et les gènes de la PGHS-2 du rat (Feng et coll., 1993), de l'humain (Hla et coll., 1992 ; Appleby et coll., 1994 ; Kosaka et coll., 1994 ; Tazawa et coll., 1994), de la souris (Fletcher et coll., 1992), du cheval (Boerboom et coll., 1997) et de la vache (Antaya et coll., 1998 ; Liu et coll., 2001) furent ensuite clonés en utilisant la séquence de l'ADNc de la PGHS-2 murine.

2.2.1.4 Structure des ADNc codant pour les PGHS-1 et PGHS-2

Une comparaison des ADNc de la PGHS-1 et PGHS-2 murines et de leurs protéines déduites est illustrée dans la Figure 3. Les ADNc de la PGHS-1 et de la PGHS-2 ont des structures similaires, comportant une région 5' non codante d'environ 100 paires de bases (pb) et un cadre de lecture ouvert d'environ 1800 pb. Ils diffèrent dans leur région 3' non codante: dans l'ADNc de la PGHS-2 de différentes espèces, cette région comporte deux à trois signaux de polyadénylation et de nombreuses répétitions (18 chez la souris) de la séquence ATTTA de Shaw-Kamen qui confèrent l'instabilité à l'ARNm (Shaw et coll., 1986). La région 3' non codante de l'ADNc de la PGHS-1 comporte un seul signal de polyadénylation et ne comporte aucun motif de Shaw-Kamen (Dewitt et coll., 1988 ; Feng et coll., 1993). L'ARNm codant pour la PGHS-1 a une longueur d'environ 2,8 kb chez la souris (Kujubu et coll., 1991) et l'humain (Hla et coll., 1992). La longueur du transcrit de la PGHS-2 est d'environ 4,0 kb (O'Banion et coll., 1992).

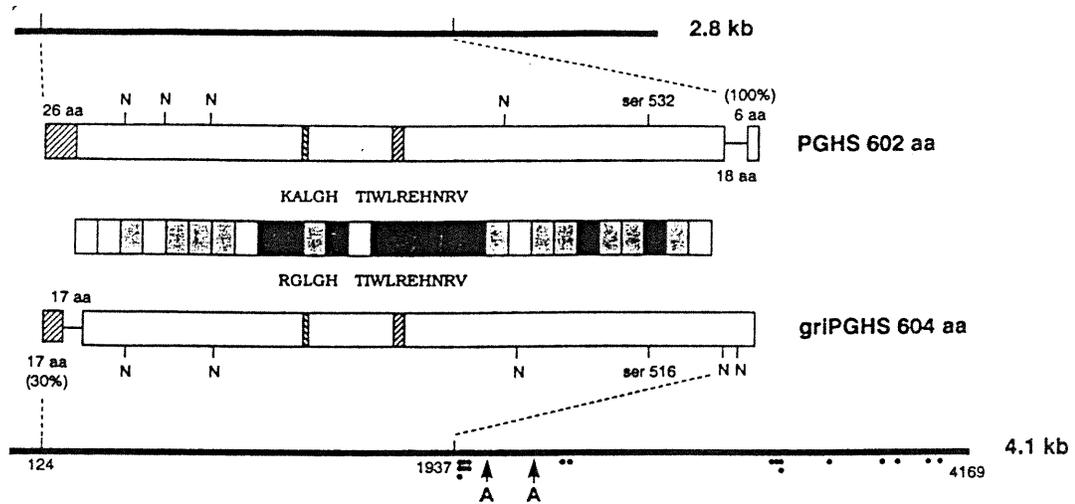


Figure 3. Comparaison schématique des structures des ADNc et des protéines PGHS-1 (2.8 Kb / 602 aa) et PGHS-2 (4.1 Kb / 604 aa) de souris. Les ADNc sont représentés en traits gras en haut et en bas de la figure. Les symboles • et A, indiquent les motifs de Shaw-Kamen et les signaux de polyadénylation, respectivement. Les tailles des ARNm sont indiquées à droite des ADNc. Les structures des protéines sont schématisées de façon colinéaire. Sur chaque protéine sont indiqués le peptide signal (26 acides aminés dans la PGHS-1 et 17 dans la PGHS-2), les sites de N-glycosylation (N), les sérines acétylées par l'aspirine (Ser 532 dans la PGHS-1 et Ser 516 dans la PGHS-2) et les sites axial (TIWLREHNRV) et distal (KALGH/RGLGH) de liaison de l'hème. L'emplacement de l'insert de 18 acides aminés est indiqué près de l'extrémité N-terminale de la PGHS-1. Les barres noires au centre de la figure indiquent les régions de plus forte homologie (>80%). L'identité de séquence entre les deux protéines est de 65%. griPGHS (glucocorticoid-regulated inflammatory PGHS) (d'après O'Banion et coll., 1992).

2.2.1.5 Structure des protéines PGHS-1 et PGHS-2

Les séquences en acides aminés déduites des ADNc de la PGHS-1 et de la PGHS-2 de plusieurs espèces ont révélé que les deux protéines ont des longueurs et des structures similaires, comportant respectivement 602 et 604 acides aminés chez la souris (Figure 3)(O'Banion et coll., 1992). Les protéines sont organisées en trois domaines successifs (Figure 4) : le domaine semblable au facteur de croissance épidermique (EGF) impliqué dans l'homodimérisation, le domaine de liaison à la membrane et le domaine catalytique contenant le site cyclooxygénase et le site peroxydase (Smith et coll., 1996). Des acides aminés fonctionnellement importants sont conservés entre les deux PGHS, incluant les sites potentiels de N-glycosylation, les histidines proximale et distale qui lient l'hème, la tyrosine impliquée dans la catalyse (tyr 385 dans la PGHS-1 et tyr 371 dans la PGHS-2) et la sérine acétylée par l'aspirine (ser 532 dans la PGHS-1 et ser 516 dans la PGHS-2) (Figure 3) (Smith et coll., 1996). Les deux protéines diffèrent quant à la longueur de leur peptide signal qui comporte 26 acides aminés dans la PGHS-1 contre 17 dans la PGHS-2 chez la souris ainsi que dans leur région C-terminale qui comporte dans la PGHS-2 un insert de 18 acides aminés absent dans la PGHS-1 (Figure 3) (Smith et coll., 1996). Les structures tridimensionnelles des deux protéines déterminées par cristallographie de la PGHS-1 ovine (Picot et coll., 1994) et humaine (Kurumbail et coll., 1996) sont similaires (Figure 4). Le site cyclooxygénase apparaît sous forme d'un long canal hydrophobe ayant une forme différente et une taille plus

grande dans la PGHS-2, facteurs qui seraient à l'origine de la différence de sélectivité des deux enzymes pour les substrats et les inhibiteurs (Garavito et coll., 1999).

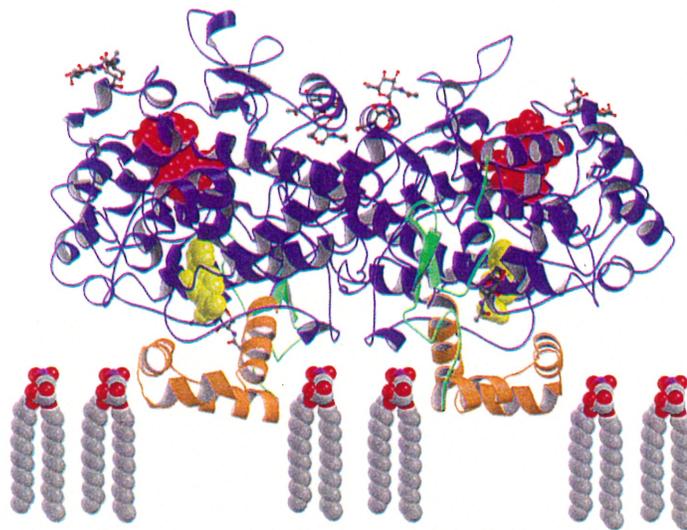


Figure 4. Schéma de la structure dimérique de la PGHS-1 ovine cristallisée. Le domaine semblable à l'EGF, le domaine de liaison à la membrane et le domaine catalytique sont colorés respectivement en vert, orange et bleu. Sont également représentés le site peroxydase contenant l'hème (rouge), le site cyclooxygénase lié à une molécule de flurbiprofène (jaune) et la position putative du feuillet interne de la bicouche lipidique du réticulum endoplasmique (d'après Picot et coll., 1994).

2.2.1.6 Localisation cellulaire de la PGHS-1 et PGHS-2

Les deux PGHS sont des protéines membranaires intégrées présentes à la surface interne de la membrane du réticulum endoplasmique et des

membranes interne et externe de l'enveloppe nucléaire (Spencer et coll., 1998). L'acide arachidonique est fourni aux deux enzymes par la sPLA₂ qui agit à la surface de la membrane plasmique et aussi par la cPLA₂ qui subit une translocation Ca²⁺-dépendante vers la surface cytosolique du réticulum endoplasmique et de la membrane externe et peut-être de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (Smith et coll., 1996).

2.2.1.7 Inhibition de la PGHS-1 et de la PGHS-2 par les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Les deux PGHS sont les cibles des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui inhibent l'activité cyclooxygénase en se liant au site cyclooxygénase à la place du substrat mais qui n'affectent pas l'activité peroxydase des deux enzymes (Smith et coll., 1996). Les AINS dits classiques, conventionnels ou non sélectifs de classe I (piroxicam, naproxen, sulindac, ibuprofène), de classe II (indométhacine, flurbiprofène) et de classe III (aspirine) inhibent l'activité des deux PGHS avec une sélectivité plus importante envers la PGHS-1. Les AINS récents dits de classe IV ou AINS sélectifs tels le célécoxib et le rofécoxib inhibent préférentiellement la PGHS-2 avec une sélectivité de 10 à plus de mille fois supérieure pour la PGHS-2 (Dewitt et coll., 1999) (Figure 6). Les AINS non sélectifs de classe I sont des inhibiteurs compétitifs réversibles alors que les AINS de classe II sont des inhibiteurs réversibles dont l'effet est dépendant du temps car leur liaison induit un changement conformationnel de l'enzyme (Smith et coll., 1996). Les AINS de classe IV sont des inhibiteurs compétitifs pour la

PGHS-1 mais des inhibiteurs dépendants du temps pour PGHS-2 (Dewitt et coll., 1999). L'aspirine est le seul AINS à inhiber les deux PGHS de façon covalente et irréversible en introduisant un groupe acétyl sur l'hydroxyl de la sérine 516 de la PGHS-1 et la sérine 532 de la PGHS-2 (Smith et coll., 1996 ; Dewitt et coll., 1999).

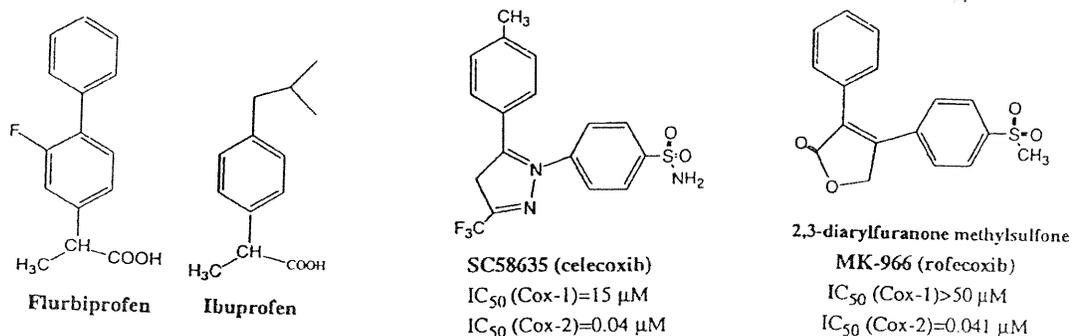


Figure 5. Structure de quelques anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), non sélectifs (flurbiprofène et ibuprofène) et sélectifs (célécoxib et rofécoxib). La sélectivité préférentielle du célécoxib et du rofécoxib pour la PGHS-2 est conférée par leur groupe sulphonamide et méthylsulphone respectivement. IC_{50} (concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition) (d'après Dewitt et coll., 1999).

2.2.2 Structure des gènes de la PGHS-1 et de la PGHS-2 et régulation de l'expression de la PGHS-2

2.2.2.1 Structure des gènes de la PGHS-1 et de la PGHS-2

Les PGHS-1 et -2 sont les produits de deux gènes distincts localisés sur des chromosomes différents. Les gènes des PGHS-1 et -2 humaines sont localisés respectivement sur les chromosomes 9 (9q32-q33.3) et 1 (1q25.2-2q25.3) (Funk et coll., 1991 ; Tazawa et coll., 1994). La figure 6 montre la structure comparée des gènes codant pour les PGHS-1 et -2 humaines. Les deux gènes ont des structures similaires. Le gène codant pour la PGHS-2 a une longueur d'environ 8 kb et comporte 10 exons et 9 introns (Kosaka et coll., 1994). Le gène codant pour la PGHS-1 a 11 exons et une taille de 22 kb. La taille des exons et les frontières exon/intron sont conservées entre les deux gènes ; la différence de taille est due à la taille plus grande des introns dans le gène PGHS-1 (Kosaka et coll., 1994). La région promotrice du gène de la PGHS-2 (Figure 6) comporte une boîte TATA et de nombreuses séquences régulatrices impliquées dans la régulation de l'expression de la PGHS-2 en accord avec l'identification de ce gène comme gène de réponse précoce immédiate dont l'expression est étroitement contrôlée (O'Banion, 1999 ; Kosaka et coll., 1994). La région promotrice du gène codant pour la PGHS-1 ne comporte pas de boîte TATA en accord avec son identification comme gène domestique dont l'expression est constitutive et peu contrôlée (O'Banion, 1999).

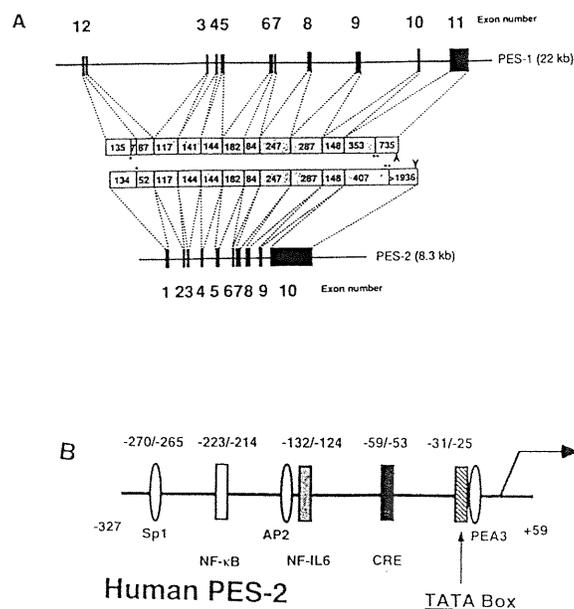


Figure 6. (A) Comparaison schématique de la structure exon-intron des gènes PGHS-1 (PES-1) et PGHS-2 (PES-2) humaines. Les boîtes noires indiquent les exons qui sont identifiés par des nombres. Les chiffres à l'intérieur des boîtes indiquent le nombre de nucléotides des exons. Les boîtes en gris et en blanc indiquent les régions codantes et non codantes respectivement. Les symboles *, ** et les têtes de flèches indiquent respectivement le codon d'initiation, le codon de terminaison et le signal de polyadénylation (d'après Kosaka et coll., 1994) ; (B) Schéma de la région promotrice du gène PGHS-2 humain (PES-2) montrant la boîte TATA et les séquences régulatrices potentielles indiquées par des ellipses et des boîtes dans la région comprise entre -327 et +59. Les chiffres indiquent la position des éléments de réponse relative au site d'initiation de la transcription indiqué par la flèche (d'après Inoue et coll., 1995).

2.2.2.2 Régulation de l'expression de la PGHS-2

Alors que l'expression de la PGHS-1 est généralement constitutive et ubiquitaire et qu'elle est responsable de la synthèse basale des prostaglandines, l'expression de la PGHS-2 est indétectable dans la majorité des tissus dans les conditions normales (O'Banion, 1999). Cependant, en réponse à des stimuli extracellulaires et pathophysiologiques, l'expression de la PGHS-2 est induite à des concentrations élevées dans la plupart des types cellulaires. Cette induction est toujours rapide, forte et transitoire et s'accompagne de l'élévation des concentrations de l'ARNm, de la protéine et de la synthèse des prostaglandines (O'Banion, 1999). Les prostaglandines sont des médiateurs dans les processus cellulaires cruciaux que sont la prolifération, la croissance, la différenciation et l'apoptose. Leurs concentrations sont donc maintenues très basses dans les conditions quiescentes par un étroit contrôle s'exerçant à toutes les étapes de leur synthèse. Toutefois les deux étapes majeures de cette voie qui sont la libération de l'acide arachidonique et la synthèse des prostaglandines sont les plus étroitement surveillées par un contrôle coordonné de l'activité des PLA₂ et de la PGHS-2 (O'Banion, 1999 ; Balsinde et coll., 1999). La PGHS-2 est contrôlée positivement par de nombreux stimuli incluant les agents pro-inflammatoires, les facteurs de croissance, les promoteurs de tumeurs, les hormones, les oncogènes, le stress oxydatif, l'hypoxie, les procarcinogènes et les rayons ultra-violets (Sirois et coll., 1993 ; 1994 ; Xie et coll., 1995 ; Schmetdje et coll., 1997 ; Fosslie, 2000 ; Yan et coll.,

2000 ; Liu et coll., 2001). La PGHS-2 est contrôlée négativement par les glucocorticoïdes, les rétinoïdes, les cytokines anti-inflammatoires, les anti-oxydants et la protéine p53 (Mestre et coll., 1997 ; Newton et coll., 1998 ; Hansen et coll., 1999 ; Subbaramaiah et coll., 1999). Tous ces facteurs contrôlent l'expression du gène de la PGHS-2 au plan transcriptionnel ; certains, cependant, contrôlent l'expression de la PGHS-2 au plan post-transcriptionnel (Dean et coll., 1999 ; Dixon et coll., 2000 ; Sheng et coll., 2000). Le contrôle de l'expression de la PGHS-2 est médiée *via* les voies des MAPKs. Une dérégulation de la synthèse des prostaglandines est observée dans l'inflammation chronique et les cancers (Marks et coll., 2000).

2.2.3 Fonctions de la PGHS-2

2.2.3.1 Fonctions physiologiques de la PGHS-2

La PGHS-2 est impliquée dans de nombreux processus physiologiques incluant notamment : 1) la reproduction où elle est requise dans les processus de l'ovulation (Sirois et coll., 1994 ; 1997), de la maturation ovocytaire, de la fécondation, de l'implantation et de la décidualisation (Langenbach et coll., 1999) ; 2) les fonctions cérébrale, rénale et gastro-intestinale ; 3) le remodelage des os ; 4) les réponses immunitaire, inflammatoire et fébrile (Dubois et coll., 1998). L'inactivation du gène de la PGHS-2 cause : 1) l'infertilité des souris femelles ; 2) la mortalité des animaux par insuffisance rénale due à une néphropathie sévère post-natale ; 3) l'abolition de la réponse fébrile et des anomalies de la réponse inflammatoire (Dinchuk et coll., 1995 ; Morham et coll., 1995).

2.2.3.2 Rôle de la PGHS-2 dans l'inflammation

Le métabolisme de l'acide arachidonique est d'une importance fondamentale dans l'inflammation (Fosslien, 2000). Des évidences nombreuses impliquent la PGHS-2 et la PGE₂ dans ce processus : 1) la PGHS-2 est exprimée à concentrations élevées dans les sites inflammatoires comme les articulations des patients atteints d'arthrite et d'ostéoarthrite (Crofford, 1997) et dans les modèles animaux de l'inflammation aiguë et chronique (Gilroy et coll., 2000) ; 2) la PGHS-2 est hautement inductible par les cytokines pro-inflammatoires telles l'interleukine-1 β (IL-1 β) et le facteur de nécrose des cellules tumorales (TNF- α) dans les cellules *in vitro* et dans les sites inflammatoires, produisant des concentrations élevées de PGE₂ (Fosslien, 2000) ; 3) la PGE₂ contrôle de nombreux gènes pro-inflammatoires dont le gène de l'interleukine 6 (IL-6) et celui de la PGHS-2 dans une variété de types cellulaires (O'Banion, 1999) ; 4) la neutralisation de la PGE₂ par un anticorps spécifique bloque l'inflammation, l'hyperalgie et la synthèse de l'IL-6 dans les modèles animaux de l'inflammation (O'Banion, 1999) ; 5) les AINS sélectifs suppriment l'inflammation (Fosslien et coll., 2000). Des évidences récentes suggèrent également un rôle anti-inflammatoire pour la PGHS-2 *via* la PGJ₂ et les récepteurs PPAR_ (Gilroy et coll., 2000).

2.2.3.3 Rôle de la PGHS-2 dans la carcinogénèse

Des évidences pharmacologiques, épidémiologiques et génétiques impliquent la PGHS-2 et les prostaglandines dans la carcinogénèse: 1) les

tumeurs humaines et animales produisent des quantités élevées de prostaglandines comparées aux tissus normaux (Thun et coll., 1994) ; 2) les AINS tels que l'aspirine, l'indométhacine et le sulindac inhibent la tumorigénèse intestinale chez l'homme (Nugent et coll., 1993) et chez les modèles animaux du cancer colorectal (Jacoby et coll., 1996); 3) l'utilisation régulière et à long terme de l'aspirine ou d'un autre AINS réduit de 50% le risque de développer le cancer colorectal (Thun et coll., 1991) et la mortalité par les autres cancers (Marks et coll., 2000). Les évidences impliquant directement la PGHS-2 sont suggérées par le fait que : 1) la PGHS-2 soit induite à des concentrations élevées dans de nombreux cancers humains qui accumulent en même temps des concentrations élevées de PGE₂ (Marks et coll., 2000) ; 2) les AINS sélectifs inhibent la tumorigénèse chez les modèles animaux du cancer colorectal (Reddy et coll., 2000 ; Oshima et coll., 2001) ; 3) la surexpression de la PGHS-2 dans les cellules épithéliales intestinales du rat rend ces cellules résistantes à l'apoptose (Tsujii et coll., 1995) ; 4) l'inactivation de la PGHS-2 chez les souris dont le gène *Apc* est muté, et qui sont un modèle animal de polypose adénomateuse familiale, cause une diminution dramatique du nombre des polypes par rapport à celui des souris sauvages (Figure 7).

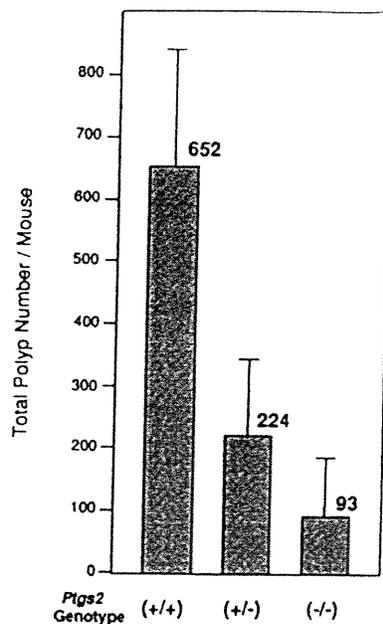


Figure 7. Effet de l'inactivation du gène PGHS-2 (*Ptgs2*) sur le nombre de polypes chez les souris dont le gène *Apc* est muté. Les souris hétérozygotes pour le gène PGHS-2 (+/-) ont un nombre de polypes intermédiaire entre celui des souris sauvages (+/+) et celui des souris déficientes pour le gène (-/-) (d'après Oshima et coll., 1996).

La PGHS-2 et les prostaglandines seraient impliquées dans les divers stades du processus de la carcinogénèse. Ainsi, la PGE_2 exercerait des effets promoteurs de tumeurs en stimulant la croissance et la prolifération des cellules tumorales (Tjandrawinata et coll., 1997), leurs propriétés invasives et métastatiques (Tsuji et coll., 1995 ; 1998), leur résistance à l'apoptose (Tsuji et coll., 1995), l'immunosuppression (Dannenber, 1999) et l'angiogénèse (Tsuji

et coll., 1998 ; Gately et coll., 2000). La PGE₂ agirait de façon autocrine ou paracrine *via* ses récepteurs EP qui activent la voie Gq 11/ PKC/ERK et également de façon intracrine *via* les récepteurs PPAR qui possèdent un élément de réponse sur le promoteur du gène PGHS-2 (Meade et coll., 1999 ; Prescott et coll., 2000). D'autre part, la réaction cyclooxygénase est la source de produits génotoxiques tels le malondialdéhyde et les espèces réactives de l'oxygène. La réaction peroxydase de la PGHS-2, de son côté, convertit de nombreux procarcinogènes environnementaux et alimentaires en carcinogènes génotoxiques (Sugimura et coll., 2000 ; Wiese et coll., 2001). Les AINS exercent leurs effets antitumoraux en inhibant tous les effets promoteurs de tumeurs dépendant des prostaglandines. Certains AINS agissent en inhibant en plus l'expression de la PGHS-2 (Xue et coll., 1999 ; Hsu et coll., 2000). D'autres agissent par des mécanismes indépendants de la PGHS-2 et des prostaglandines (Myers et coll., 2001).

2.3 L'adénocarcinome prostatique

2.3.1 Structure de la prostate

2.3.1.1 Morphologie-anatomie

La structure générale de la prostate canine est similaire à celle de l'homme (Moore, 1944). Chez le chien, la prostate est la seule glande sexuelle accessoire (Swinney, 1998). Elle est bordée dorsalement par le rectum et ventralement par la symphyse pubienne et la paroi abdominale ventrale, encerclant l'urètre prostatique à la base de la vessie et elle est entourée par

une capsule fibromusculaire (Root Kustritz et coll., 2000). La portion prostatique de l'urètre passe à travers la prostate. Le raphé médian divise la glande prostatique en lobe gauche et lobe droit, chaque lobe étant divisé en lobules par des travées capsulaires. Les lobules consistent en de nombreuses glandes tubuloalvéolaires tapissées par un épithélium cylindrique. Les conduits de ces glandes débouchent dans l'urètre sur toute sa circonférence. La prostate sécrète le liquide prostatique sous contrôle des systèmes nerveux et hormonal (Root Kustritz et coll., 2000). Chez le chien, la taille et le poids de la prostate varient avec l'âge, le poids corporel et la race de l'animal (Swinney, 1998, O'shea,1962). Chez la majorité des chiens, un accroissement progressif de la prostate a lieu avec l'âge (Berry, 1986 ; O'shea,1962). La croissance normale de la prostate canine passe par trois phases : une croissance normale chez le jeune adulte, une hyperplasie à l'âge moyen et une involution sénile (O'shea,1962). La croissance et l'activité de la prostate sont dépendantes des androgènes, la castration à n'importe quel âge entraînant une réduction marquée de sa taille (Swinney,1998 ; O'shea,1962). La prostate humaine possède une structure glandulaire comportant trois zones distinctes: la zone périphérique, la zone intermédiaire et la zone centrale. La zone périphérique est le lieu exclusif du carcinome (Mc Neal, 1980). La prostate canine ne montre pas de structure zonale et on ne sait pas si le cancer a lieu préférentiellement dans une région particulière (Waters et coll., 1997).

2.3.1.2 L'épithélium

La prostate est une glande exocrine tubuloalvéolaire. La composante glandulaire comporte des conduits et des acini dont les parois sont tapissées par un épithélium glandulaire qui est plissé au niveau des acini, formant des villosités dans la lumière acinaire. L'épithélium est formé de deux couches de cellules épithéliales : une couche de cellules sécrétrices et une couche de cellules basales non sécrétrices (Chevalier et coll., 1980 ; Lalani et coll., 1997). Des cellules épithéliales neuroendocrines sont éparpillées entre les cellules sécrétrices et les cellules basales (Lalani et coll., 1998). Les cellules sécrétrices luminales expriment phénotypiquement les cytokératines 8 et 18, la phosphatase acide prostatique (PAP), l'antigène spécifique de la prostate (PSA) et le récepteur des androgènes et requièrent les androgènes pour le maintien de leurs fonctions différenciées (Terracio et coll., 1982 ; Dionne et coll., 1983 ; Lalani et coll., 1997). L'activité de la PAP sécrétoire est exclusive aux cellules sécrétrices. Elle est contrôlée par les androgènes et constitue un marqueur de la différenciation des cellules sécrétrices (Chevalier et coll., 1980 ; Terracio et coll., 1982 ; Dionne et coll., 1983). Les cellules sécrétrices de la prostate canine diffèrent de celles de la prostate humaine dans le fait qu'elles n'expriment pas le PSA mais une protéase apparentée, l'arginine estérase ou CPSE (estérase spécifique de la prostate canine) (Bell et coll., 1995). Les cellules sécrétrices ont une activité exocrine sécrétoire synthétisant, stockant et sécrétant des composés intracellulaires spécifiques dans la lumière acinaire, tels le PSA et le CPSE. Elles ont également la capacité de transporter une variété de substances provenant du sang par un transport transmembranaire, vers la lumière acinaire

(Isaacs, 1983). La prostate canine normale et mature est caractérisée par un épithélium sécréteur cylindrique à cuboïde avec des noyaux situés basalement et un cytoplasme granuleux contenant souvent des vésicules (Chevalier et coll., 1980 ; Berry, 1986). Les cellules basales sont considérées comme des cellules souches pour les cellules sécrétrices et joueraient un rôle dans la régulation de leur croissance et de leur fonction (Chevalier et coll., 1981 ; Lalani et coll., 1997). Elles expriment les cytokératines de haut poids moléculaire mais n'expriment pas la PAP et le PSA/CPSA. Les cellules neuroendocrines représentent environ 30% des cellules de la prostate humaine (Lobaccaro et coll., 1997). Dans la prostate canine, elles sont présentes en grand nombre dans les conduits glandulaires mais leur nombre est faible dans les acini (Hanyu et coll., 1987). Ces cellules expriment le PSA, suggérant une origine commune avec les cellules sécrétrices (Lalani et coll., 1997). Elles n'expriment pas le récepteur des androgènes et sont caractérisées par leur sécrétion de neuropeptides (Lobaccaro et coll., 1997). Les neuropeptides, telles la bombésine et la sérotonine jouent le rôle de facteurs de croissance autocrines et paracrines, activant notamment le récepteur des androgènes sur les cellules voisines (Lobaccaro et coll., 1997). La différenciation neuroendocrine est observée dans virtuellement tous les carcinomes prostatiques (Di Agnese et coll., 1996). Récemment, il a été démontré que la castration chez le chien ou l'hormonothérapie chez l'homme favorise la différenciation neuroendocrine dans la prostate et que les stéroïdes la répriment (Chevalier, communication personnelle)

2.3.1.3 Le stroma

Le stroma est un mélange complexe de cellules musculaires lisses, de fibroblastes, de vaisseaux sanguins, de nerfs et de matrice extracellulaire (Aumuller, 1983). Le développement normal de la prostate est dépendant d'interactions complexes entre le stroma et l'épithélium. Ces interactions sont paracrines avec le facteur produit par les cellules stromales et le récepteur exprimé par les cellules épithéliales. Durant le développement prénatal, le mésenchyme prostatique précurseur du stroma joue un rôle fondamental dans la formation embryonnaire de la prostate (Aumuller, 1983).

2.3.1.4 Le liquide prostatique

L'activité principale de la prostate est sécrétoire, produisant le liquide prostatique qui contient des substances variées, incluant des ions (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , K^+), des composés de faible poids moléculaire (cholestérol, acides aminés), des enzymes (PAP, créatine kinase, lysozyme), des protéines (lactoferrine, céruloplasmine), des hormones stéroïdes (testostérone, dihydrotestostérone, progestérone, oestradiol) et peptidiques (LH et prolactine) (Aumuller, 1983). Le liquide prostatique est sécrété constitutivement chez les chiens mâles intacts et déversé dans l'urètre (Johnston et coll., 2000).

2.3.2 Physiologie: aspects endocrines

Le développement de la prostate à partir du sinus urogénital aussi bien que sa croissance, sa différenciation et le maintien de son fonctionnement chez l'adulte dépendent crucialement des androgènes (Sandberg 1980 ; Jenster, 1999). Chez le mâle adulte normal intact, la testostérone est l'androgène circulant majeur. Elle est produite et sécrétée principalement (> 95%) par les cellules de Leydig dans les testicules, sous contrôle des hormones hypophysaires gonadotropes notamment la LH, la FSH et la GnRH (Figure 8) (Lobaccaro et coll., 1997). Les autres androgènes sont également produits par le testicule mais à des concentrations faibles et leur activité androgénique est également faible. De plus, la déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'androstènedione produits par les surrénales peuvent également être convertis en testostérone dans la prostate (Jenster, 1999). Dans la prostate, la testostérone est convertie principalement en 5 α -dihydrotestostérone (5 α -DHT) par la 5 α -réductase prostatique (Sandberg, 1980). Cette conversion est d'une importance cruciale pour la prostate car c'est la dihydrotestostérone et non pas la testostérone qui est l'androgène actif majeur, régulant les événements de croissance, de différenciation, de survie et d'apoptose, la testostérone jouant le rôle de prohormone (Petrow, 1986 ; Jenster, 1999). La 5 α -réductase de type II est une enzyme-clé dans le développement et la fonction prostatique et elle est exprimée dans le tractus urogénital mâle (Lobaccaro, 1997). Les oestrogènes sont également essentiels à la croissance prostatique dans laquelle ils synergisent avec les androgènes (Lobaccaro et coll., 1997). Androgènes et

oestrogènes agissent *via* leurs récepteurs spécifiques qui sont présents dans le stroma et dans l'épithélium de la prostate. Leurs effets sur les cellules sécrétrices sont médiés *via* les voies des facteurs de croissance (Russell, 1998 ; Huyin et coll., 2001). Chez les chiens castrés, les oestrogènes sont de puissants inducteurs de la métaplasie des cellules basales qui expriment des kinases absentes dans la prostate normale et dans la prostate cancéreuse (Tremblay et coll., 1996). L'insuline et la prolactine joueraient aussi un rôle important dans l'homéostasie de la prostate (Sandberg, 1980 ; Lobaccaro, 1997).

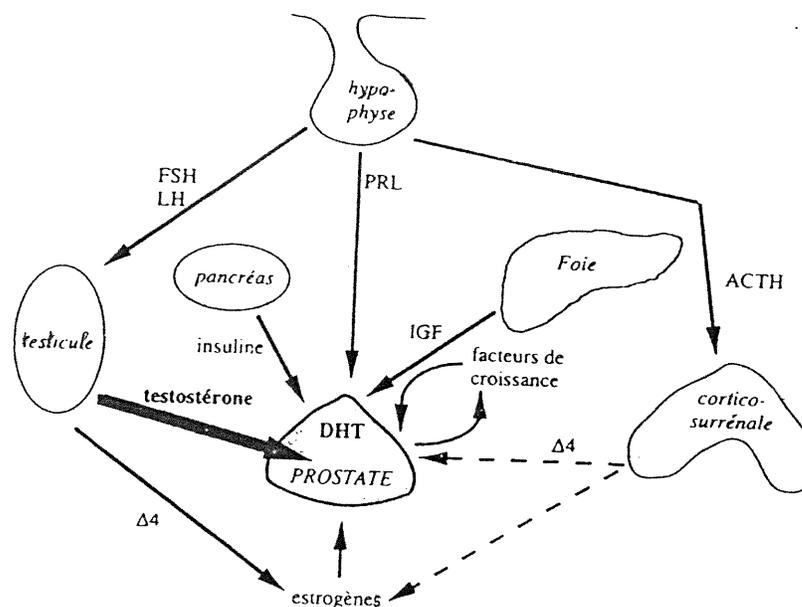


Figure 8. Représentation schématique de la régulation de la croissance prostatique. $\Delta 4$ ($\Delta 4$ -androstènedione), IGF (facteur de croissance semblable à l'insuline), DHT (dihydrotestostérone), FSH (hormone folliculo-stimulante), LH (hormone lutéinisante), ACTH (hormone adrénocorticotrope), PRL (Prolactine), (d'après Lobaccaro, 1997).

2.3.3 L'adénocarcinome prostatique canin

Les problèmes prostatiques sont importants chez l'homme et chez le chien. Le chien représente le seul animal domestique chez lequel les problèmes prostatiques sont prévalents et contribuent à la dysfonction du tractus urinaire inférieur chez les animaux d'âges moyen et avancé (Swinney, 1998). Les problèmes prostatiques canins les plus fréquents incluent l'hyperplasie prostatique bénigne, l'infection bactérienne (prostatite), les kystes et les cancers (Barsanti et coll., 1986 ; Swinney, 1998). Le cancer prostatique le plus fréquent est, comme chez l'homme, l'adénocarcinome impliquant l'épithélium glandulaire (Moore, 1944 ; Barsanti et coll., 1986 ; Swinney, 1998). Le carcinome prostatique est rare chez les animaux excepté le chien (Moore, 1944). L'examen physique effectué pour détecter le carcinome prostatique canin inclut la palpation abdominale et rectale de la prostate. La prostate normale est petite, symétrique, lisse, mobile et non douloureuse. La prostate cancéreuse est grosse, dure, asymétrique, immobile et nodulaire (Swinney, 1998). Des examens de laboratoire incluant des analyses du sang et des urines sont effectués, évaluant divers paramètres biochimiques, mais chez le chien il n'y a pas de marqueur ayant une valeur diagnostique (Bell et coll., 1995) contrairement à la situation chez l'homme où le PSA constitue le marqueur diagnostique de ce cancer (Chan et coll., 1998). Chez le chien, le diagnostic du cancer prostatique est effectué par radiographie abdominale, révélant un accroissement de la prostate et thoracique, révélant des métastases

pulmonaires et par cytologie du liquide séminal, révélant la présence de cellules cancéreuses. La confirmation du diagnostic est effectuée par biopsie et histopathologie (Bell et coll., 1991 ; Swinney, 1998). Chez le chien, l'incidence vraie de l'adénocarcinome prostatique n'est pas connue. La prévalence, rapportée par les études de nécropsies, varie de 0,2 à 0,6% (Bell et coll., 1991). Cette faible prévalence serait attribuée en partie à la difficulté rencontrée dans la confirmation du diagnostic et pourrait être en réalité plus élevée (Waters et coll., 1998 ; Swinney, 1998). L'adénocarcinome prostatique est plus fréquemment diagnostiqué chez les chiens domestiques âgés, la moyenne d'âge au diagnostic étant de 10 ans (Bell et coll., 1991). Quand l'âge chronologique du chien est converti en âge physiologique, la moyenne d'âge au diagnostic est similaire chez le chien et chez l'homme (67 ans contre 70 ans, respectivement) (Waters et coll., 1996). Ainsi chez les deux espèces, le cancer de la prostate a la caractéristique d'être lié à l'âge (Moore, 1944). Aucune prédisposition de race n'a été identifiée bien qu'une prévalence plus élevée soit rapportée chez les races de moyenne et grande taille. Le carcinome a lieu aussi bien chez les chiens sexuellement intacts que chez les chiens castrés, le risque semblant toutefois quatre fois plus important chez les chiens castrés (Bell et coll., 1991 ; Waters et coll., 1998). La prostate étant dépendante des androgènes testiculaires, la castration entraîne la régression de la prostate chez les chiens normaux et ceux avec hyperplasie bénigne (O'shea, 1962 ; Swinney, 1998). Plusieurs suggestions ont été faites pour expliquer le développement du carcinome chez les chiens castrés, incluant un rôle pour les androgènes surrénaliens et pour la prolactine (Bell et coll., 1991). La moitié des chiens avec

carcinome prostatique est composée d'animaux qui ont été castrés à l'âge adulte (moyenne d'âge 5 ans) et qui ont développé le cancer 5 à 6 ans plus tard, suggérant que le carcinome prostatique canin est une maladie des chiens âgés intacts et des chiens castrés à l'âge adulte (Waters et coll., 1998). L'adénocarcinome prostatique canin est insidieux et hautement malin (Bell et coll., 1991 ; Swinney, 1998): la maladie est déjà à un stade avancé avec 80% et 89% des chiens présentant des métastases au moment du diagnostic et à la nécropsie, respectivement (Swinney, 1998). La propagation métastatique est fréquente principalement aux ganglions lymphatiques iliaques, aux vertèbres lombo-sacrées, aux os du bassin et aux poumons. Comme chez l'homme, le cancer prostatique canin a une prédilection pour les métastases osseuses et les vertèbres en sont un site fréquent (Durham et coll., 1986 ; Lee-parritz et coll., 1988). Le carcinome prostatique canin implique toute la glande prostatique contrairement à la situation chez l'homme où il affecte uniquement la zone périphérique (Walters et coll., 1998). Le traitement idéal est la prostatectomie quand la tumeur est localisée. Cependant, ceci est rarement le cas car le carcinome prostatique étant insidieux et silencieux, les chiens présentés en consultation sont souvent au stade métastatique de la maladie et dans ce cas la prostatectomie n'est pas recommandée (Swinney, 1998). La thérapie palliative, incluant la castration ou l'administration d'antiandrogènes ou d'oestrogènes, est inefficace car le carcinome canin avancé est indépendant des androgènes (Swinney, 1998). Moins de 10% des chiens diagnostiqués avec métastases sont encore en vie deux à trois semaines après le diagnostic. L'euthanasie est

généralement la meilleure décision quand le diagnostic du carcinome est fait (Swinney, 1998).

2.3.4 La néoplasie prostatique intraépithéliale

La néoplasie prostatique intraépithéliale (PIN) est une lésion précancéreuse qui est considérée comme le précurseur le plus probable de l'adénocarcinome prostatique chez l'homme et chez le chien (Waters et coll., 1997 ; Bostwick, 1998). Cette lésion qui progresse du grade faible (PIN) au grade élevé (HGPIIN) (High grade PIN) puis au stade invasif précoce, est caractérisée par des altérations incluant une perturbation progressive de la membrane basale, la perte des marqueurs de la différenciation sécrétoire, des anomalies nucléaires et nucléolaires, un potentiel prolifératif accru, une densité accrue de microvaisseaux, une variation dans le contenu en ADN et une perte d'hétérozygotie (Waters et coll., 1997 ; Bostwick, 1998). Chez le chien et chez l'homme, le HGPIIN coexiste avec le carcinome dans la plupart des cas. Il est lié à l'âge et il est dépendant des androgènes. Cette observation confirme l'hypothèse que la plupart des carcinomes diagnostiqués chez les chiens sont des carcinomes avancés qui sont devenus androgéno-indépendants (Walters et coll., 1998). Le HGPIIN est considéré comme un stade intermédiaire entre l'épithélium normal et le carcinome invasif, donc un stade de transition vers la carcinogénèse prostatique sur lequel on peut agir pour bloquer la progression en carcinome par des agents chimiopréventifs. Dans ce sens, le chien

représente un modèle utile pour l'expérimentation des agents chimiopréventifs potentiels (Waters et coll., 1997).

2.3.5 Altérations moléculaires dans le cancer de la prostate

L'adénocarcinome prostatique est, comme tous les cancers, un processus dont la progression comporte plusieurs stades et grades aussi bien chez le chien (Waters et coll., 1998) que chez l'homme (Gleason, 1966 ; von Eschenbach, 1996). Chez l'homme, ce cancer progresse par trois stades et trois grades : 1) le stade où la tumeur est localisée, bien différenciée et dépend des androgènes pour sa croissance. La thérapie appliquée à ce stade est la chirurgie (prostatectomie) (Von Eschenbach et coll., 1996); 2) le stade où la tumeur est invasive, déborde des limites de la prostate, est modérément différenciée mais n'a pas encore acquis les propriétés métastatiques et dépend encore des androgènes pour sa croissance ; 3) le stade métastatique où la tumeur est peu différenciée. Au début de ce stade, la tumeur est encore dépendante des androgènes et c'est à ce moment que la thérapie hormonale est appliquée, la chirurgie devenant inutile. La durée de ce stade est variable et il est invariablement suivie d'un stade où la tumeur a acquis son autonomie par rapport aux androgènes ; c'est le stade dit androgéno-indépendant qui est réfractaire à l'hormonothérapie (Bruckheimer et coll., 1999). La progression est caractérisée par une série d'altérations moléculaires identifiées dans des études chez l'homme, incluant principalement des altérations génétiques, du récepteur des androgènes et du métabolisme de l'acide arachidonique.

2.3.5.1 Altérations génétiques

Les réarrangements chromosomiques observés dans le cancer de la prostate sont généralement des délétions (Lalani et coll., 1997). L'altération la plus fréquente est la perte de l'hétérozygotie (LOH) (loss of heterozygoty) touchant les chromosomes 17p, 13q,10q, 11p et 16q qui portent les gènes suppresseurs de tumeurs p53, Rb1, PTEN, KAI1 et E-cadhérine respectivement (Ruijter et coll., 1999). L'inactivation de ces gènes est associée au développement du cancer, à sa progression et à sa transition vers l'androgène-indépendance et elle est associée à un pronostic défavorable (Daliani et coll., 1999). Les altérations touchant les oncogènes ne sont pas très fréquentes dans le cancer de la prostate. L'oncogène le plus fréquemment activé est erbB-2 (Bostwick, 1994 ; Ruijter et coll., 1999).

2.3.5.2 Altérations du récepteur des androgènes

Les altérations du récepteur des androgènes ont des conséquences majeures dans l'adénocarcinome prostatique: elles sont responsables de son déclenchement précoce, de sa progression et de sa transition vers l'androgène-indépendance, en affectant l'activité, la spécificité et l'affinité du récepteur. Les altérations qui affectent l'activité du récepteur incluent : 1) le polymorphisme CAG dans l'exon 1 du gène qui résulte en des variants du récepteur ayant une queue polyglutamine N-terminale plus courte et une activité plus importante par

rapport au variant normal (Ross et coll., 1997); 2) les mutations qui inactivent le récepteur ; ces mutations ont lieu dans le cancer localisé et sont responsables de la progression du cancer car elles fournissent aux cellules un avantage de croissance en leur permettant d'échapper au contrôle anti- prolifératif du récepteur (Jenster, 1999). En effet, le récepteur des androgènes contrôle indirectement les événements de croissance, de survie, de différenciation et d'apoptose des cellules épithéliales prostatiques normales et tumorales en exerçant un double contrôle positif et négatif sur les voies des facteurs de croissance qui contrôlent ces événements cellulaires (Figure 9) (Jenster, 1999). D'autres altérations importantes du récepteur incluent les mutations qui affectent la spécificité et l'affinité du récepteur. Les mutations qui affectent la spécificité du récepteur ont lieu dans le domaine de liaison du ligand et ont pour conséquence d'élargir la spécificité du récepteur à d'autres ligands permettant son activation par les oestrogènes, les androgènes surrénaliens, les antiandrogènes (Jenster, 1999 ; Daliani et coll., 1999) et les glucocorticoïdes (Xia-Yan-Zao et coll., 2000). Les altérations qui affectent l'affinité du récepteur consistent en une amplification génique résultant en des concentrations accrues du récepteur. Les altérations qui affectent la spécificité et l'affinité du récepteur ont lieu plus fréquemment dans le cancer androgéno-indépendant et constituent une adaptation des cellules tumorales à l'environnement appauvri en androgènes prévalant suite à l'ablation de ces hormones (Jenster, 1999). L'inactivation du récepteur des androgènes a des conséquences majeures dans le cancer de la prostate, incluant la perte des interactions entre le stroma et l'épithélium qui sont contrôlées par le récepteur. Dans la prostate normale et le

cancer précoce, ces voies sont paracrines (Figure 10). Dans le cancer avancé, la plupart de ces voies deviennent autocrines (Russell et coll., 1998). D'autres conséquences de l'inactivation du récepteur des androgènes sont l'induction de la protéine anti-apoptotique Bcl2 et la perte de la protéine d'adhésion E-cadhérine contrôlées respectivement de façon négative et positive par ce récepteur. Dans la prostate normale et dans le cancer précoce, la protéine Bcl-2 est indétectable alors que la protéine E-cadhérine est exprimée. Dans le cancer avancé, la situation s'inverse. Une corrélation très forte est observée entre l'induction de Bcl2, la perte de la E-cadhérine et le grade élevé du cancer (Bruckheimer et coll., 1999 ; Ruijter et coll., 1999).

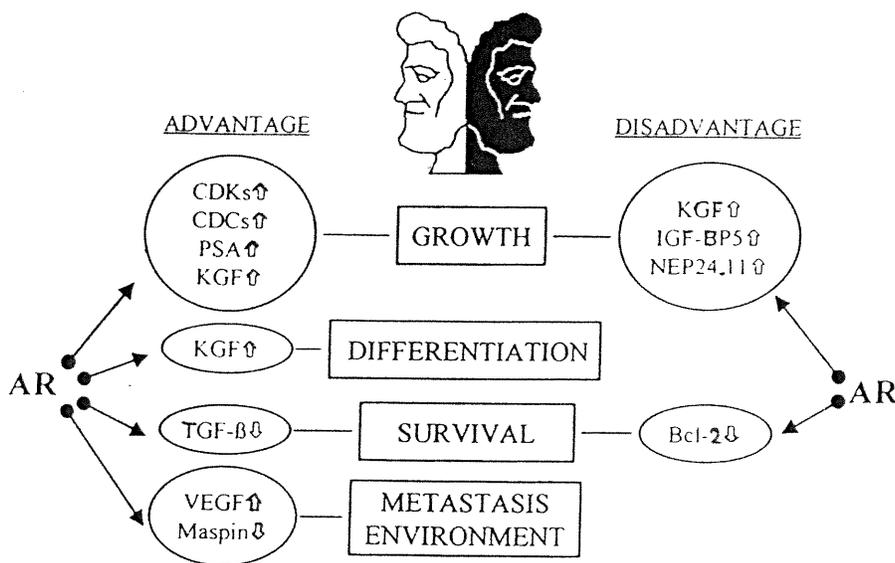


Figure 9. Représentation schématique de la double face de l'action des androgènes dans la prostate. La voie du récepteur des androgènes (AR) contrôle la croissance, la différenciation et la survie des cellules épithéliales prostatiques normales et cancéreuses en stimulant ces événements par une régulation positive (\uparrow) de l'expression des gènes du cycle cellulaire (kinases dépendantes des cyclines (CDK) et cyclines C et D (CDC), du facteur de croissance des kératinocytes (KGF) et du PSA et une régulation négative (\downarrow) du facteur de croissance transformant β (TGF β). La voie du récepteur module en même temps ces événements par une régulation positive du KGF (promouvant la différenciation terminale), de la protéine de liaison des IGF (IGBP5) (modulant les effets mitogéniques des IGF) et une régulation négative de bcl2 (promouvant l'apoptose) (d'après Jenster, 1999).

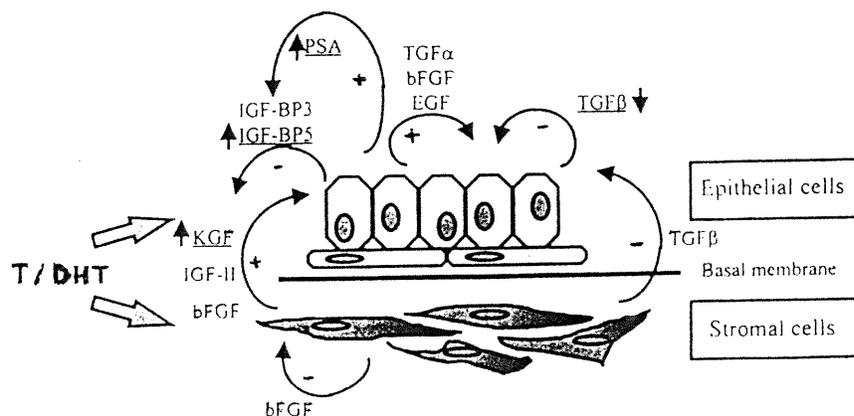


Figure 10. Schéma montrant les effets des facteurs de croissance sur les cellules épithéliales et stromales de la prostate normale. Les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (stroma) produisent des facteurs de croissance tels que KGF, IGF-II, bFGF et TGF β qui stimulent (+) ou répriment (-) les cellules épithéliales en terme de croissance, de différenciation et d'apoptose. Les cellules épithéliales produisent des facteurs qui stimulent ou inhibent leur propre prolifération tels que le TGF α , l'IGBP, le PSA, l' EGF et le TGF β . L'expression de l' IGFBP5, du KGF, du PSA et du TGF β est contrôlée positivement (\uparrow) ou négativement (\downarrow) par les androgènes. T (testostérone) DHT (dihydrotestostérone) (d'après Jenster, 1999).

2.3.5.3 Altérations du métabolisme de l'acide arachidonique

Une autre altération majeure observée dans le cancer de la prostate est l'activation excessive du métabolisme de l'acide arachidonique avec accumulation de PGE₂ (Marks et coll., 2000). Une augmentation des

concentrations de la PGE₂ de dix fois a été rapportée dans l'adénocarcinome prostatique humain (Chaudry et coll., 1994). Les prostaglandines n'étant pas normalement stockées après leur synthèse, cette accumulation reflète des altérations à plusieurs étapes du métabolisme de l'acide arachidonique, incluant une libération accrue de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires et un approvisionnement constant des enzymes PGHS et lipoxygénase. La libération accrue de l'acide arachidonique implique une activation permanente des phospholipases cPLA₂ et sPLA₂ durant le développement tumoral telle que démontrée dans le tissu prostatique tumoral humain et du rat (Faas et coll., 1996). La libération accrue de l'acide arachidonique entraîne une altération de la composition des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires. En effet, Chaudry et coll. (1994) et Faas et coll. (1996) ont rapporté une réduction significative des concentrations de l'acide arachidonique et de l'acide linoléique des phospholipides dans l'adénocarcinome prostatique humain. Cette réduction est due à la conversion de ces acides gras en prostaglandines de la série 2 qui sont des promoteurs de tumeurs (Marks et coll., 2000). Une modification similaire a été rapportée dans l'adénocarcinome prostatique canin par Griffith et coll. (1997). Cette altération de la composition en acides gras des phospholipides implique une altération de l'activité de l'enzyme qui contrôle le cycle de remodelage des acides gras des phospholipides, la lysophosphatidylcholineacyltransférase dont l'activité est augmentée de cinq à treize fois dans le cancer prostatique humain et du rat (Faas et coll., 1996). L'activation du cycle de remodelage signifie une augmentation de l'incorporation

et de la libération de l'acide arachidonique dans le phosphatidylinositol, ce qui explique l'activation de la phospholipase C (PLC) et du cycle du phosphatidylinositol avec production excessive du DAG et de l'IP₃ observée dans l'adénocarcinome prostatique (Chaudry et coll., 1994). L'augmentation de ces messagers secondaires serait responsable en partie de l'initiation, du maintien et de la prolifération cellulaire *via* l'activation de la voie de la protéine kinase C (PKC) (Chaudry et coll., 1994; Marks et coll., 2000). Dans les conditions normales, seule une partie de l'acide arachidonique libéré par les PLA₂ est convertie en eicosanoïdes par les enzymes PGHS et lipoxygénases. Les altérations du métabolisme de l'acide arachidonique dans le cancer de la prostate seraient dûes à l'altération de l'activité de ces enzymes, elle-même dûe à une altération de leur expression. En effet, la PGHS-2 est induite à des concentrations élevées dans plusieurs types de cancers humains incluant celui de la prostate.

2.3.5.4 Induction de la PGHS-2 dans le cancer de la prostate

La première évidence de l'induction de la PGHS-2 dans le cancer de la prostate a été observée chez le chien au cours d'une étude portant sur 24 cas d'adénocarcinome prostatique (Tremblay et coll., 1999). L'expression des protéines PGHS-2 et PGHS-1 était recherchée par immunohistochimie et immunoblot. Dans les prostates normales, seule la PGHS-1 était exprimée et cela exclusivement dans le stroma. Dans les prostates cancéreuses, la PGHS-1 était exprimée dans le stroma et faiblement dans les cellules épithéliales mais la

PGHS-2 était fortement exprimée dans les cellules épithéliales dans la majorité des adénocarcinomes. L'induction de la PGHS-2 a également été rapportée dans le cancer prostatique humain (Gupta et coll., 2000 ; Uotila et coll., 2001) et dans les lignées cellulaires prostatiques cancéreuses humaines (Hsu et coll., 2000 ; Subbarayan et coll., 2001). De nombreuses évidences indiquent un rôle important des prostaglandines dans le cancer de la prostate: 1) la PGHS-2 est présente dans le cancer de la prostate canine (Tremblay et coll., 1999), humaine (Gupta et coll., 2000) et dans les lignées cellulaires prostatiques cancéreuses humaines (Subbarayan et coll., 2001) ; 2) des concentrations élevées de PGE₂ sont produites par les tumeurs et les cellules prostatiques tumorales en cultures et sont associées au cancer avancé avec tumeurs agressives et métastatiques ainsi qu'à un mauvais pronostic (Madaan et coll., 2000); 3) la PGE₂ joue un rôle majeur dans la croissance des cellules cancéreuses prostatiques *in vitro* (Tjandrawinata et coll., 1997) ; 4) les AINS sélectifs inhibent la croissance des cellules tumorales prostatiques cultivées *in vitro* (Hsu et coll., 2000 ; Attiga et coll., 2000 ; Liu et coll., 2000) et induisent l'apoptose dans les cellules épithéliales exprimant la PGHS-2 (Liu et coll., 1998). Les mécanismes par lesquels la PGHS-2 et les prostaglandines promouvoient la carcinogenèse prostatique sont les mêmes que ceux décrits pour les autres cancers. Cependant, dans la prostate, les prostaglandines médient en plus les effets carcinogènes des hormones et des graisses alimentaires qui agissent en induisant l'expression de la PGHS-2 (Badawi et coll., 2000). En effet, tous les acides gras polyinsaturés induisent fortement l'expression de la PGHS-2 au niveau transcriptionnel *via* les récepteurs PPARs

qui se lie à un élément de réponse PPARE localisé dans le promoteur du gène PGHS-2 (Meade et coll., 1999). De leur côté, les androgènes (Fosslien, 2000) et les hormones hypophysaires (Sirois et coll., 1992 ; 1993 ; 1994) favorisent l'expression de la PGHS-2 et la synthèse de la PGE₂ et stimulent la croissance des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses *in vitro* (Madani et coll., 2000).

2.3.6 Etiologies de l'adénocarcinome prostatique

Les facteurs de risque de cancer de la prostate chez le chien demeurent inconnus. Chez l'homme, les deux facteurs de risque les plus importants sont l'âge et la racio-ethnicité (Ross et coll., 1998). Le cancer de la prostate a rarement lieu avant l'âge de quarante ans mais au-delà, son incidence croît de façon linéaire avec l'âge contrairement aux autres cancers épithéliaux où la courbe incidence-âge n'est pas linéaire (Ross et coll., 1998). L'incidence du cancer de la prostate est la plus élevée parmi les cancers épithéliaux (Ross et coll., 1998) suggérant des facteurs étiologiques spécifiques. La dépendance de la prostate pour les androgènes a rapidement suggéré une étiologie hormonale dans ce cancer (Ross et coll., 1998). D'autre part, les variations racio-ethniques dans l'incidence de ce cancer suggèrent que les facteurs génétiques pourraient jouer un rôle central dans la détermination du risque (Ross et coll., 1998). Un modèle polygénique a été développé, centré sur une série de gènes impliqués dans la biosynthèse (cytochrome P450c17 α), l'activation (5 α -réductase), le transport (récepteur) et le métabolisme (3 β hydroxystéroïde déshydrogénase)

des androgènes (Ross et coll., 1998). Ces gènes montrent, en effet, un polymorphisme avec une variation allélique interraciale associée à la variation de l'incidence parmi les groupes racio-ethniques (Ross et coll., 1998). Pour certains de ces gènes, notamment ceux codant pour le récepteur des androgènes et la 5 α -réductase, il y a des évidences que les allèles à haut risque sont plus fréquents dans les populations à haut risque. Ainsi, les allèles (CAG) les plus courts du récepteur des androgènes prédisposeraient les hommes au cancer de la prostate (Ross et coll., 1998). Cependant, comme dans tous les cancers, le cancer prostatique est affecté par de multiples facteurs incluant les graisses alimentaires, la vitamine E et la signalisation par l'IGF (Ross et coll., 1998). En outre, un facteur familial est suggéré par le fait qu'un risque excessif a été observé chez les hommes dont les frères ont le cancer de la prostate comparés à ceux dont le père est affecté (Ross et coll., 1998). Les gènes qui pourraient être associés avec un risque élevé du cancer de la prostate incluent le gène BRCA1 et la région de LOH au 1q24-q25, récemment identifiée (Ruijter et coll., 1999).

2.3.7 Les modèles pour l'étude de l'adénocarcinome prostatique

L'adénocarcinome prostatique a rarement lieu spontanément chez les animaux autres que l'homme. Ce cancer est inexistant chez les primates non humains. En outre, l'incidence très faible du cancer du sein chez les animaux suggère une résistance générale aux cancers hormono-dépendants (Waters et coll., 1998). Le chien représente l'exception : il est la seule espèce animale à

développer spontanément et fréquemment le cancer de la prostate (Waters et coll., 1998). Le chien constitue un modèle intéressant à cause des nombreuses similarités existant entre les adénocarcinomes prostatiques canin et humain (Waters et coll., 1998). Les autres modèles les plus couramment utilisés incluent les tumeurs prostatiques des rongeurs, les xénogreffes humaines, les souris transgéniques et les lignées cellulaires épithéliales prostatiques humaines et canines (Russell et coll., 1998 ; Navone et coll., 1999). Les modèles de rongeurs les plus utilisés sont les adénocarcinomes spontané (Dunning 2331) et induit (Pollard) chez le rat et les modèles transgénique (TRAMP) et de Reconstitution (MPR) chez la souris. Les lignées cellulaires épithéliales prostatiques cancéreuses humaines les plus couramment utilisées sont les lignées indépendantes des androgènes PC-3, DU145 et TSU, et la lignée sensible aux androgènes, LNCaP, toutes établies à partir de métastases (Russell et coll., 1998 ; Navone et coll., 1999). Les lignées canines les plus utilisées sont la lignée CAPE qui est la seule lignée épithéliale prostatique normale (Eaton et coll., 1982) et la lignée tumorale CPA 1, établie à partir d'un adénocarcinome spontané primaire canin (Eaton et coll., 1988). Une nouvelle lignée cellulaire, la lignée DCP-1, a été récemment établie à partir d'un adénocarcinome prostatique canin peu différencié. Cette lignée présente une croissance rapide et indépendante des androgènes. Elle est immunoréactive avec le PSA humain et hautement tumorigène chez les souris nues et les chiens adultes immuno-déficients (Anidjar et coll., 2001).

3. Hypothèse et objectifs

3.1 Hypothèse générale

Récemment, il a été rapporté que l'expression de la PGHS-2 est régulée de façon positive au niveau transcriptionnel dans les carcinomes colorectal (Kojima et coll., 2000) et gastrique (Lim et coll., 2001) humains et spinocellulaire cutané chez la souris (Kim et coll., 1998) ainsi que dans les cellules transformées (Subbaramaiah et coll., 1996). L'hypothèse de mon projet de maîtrise est que l'expression de la PGHS-2 est régulée dans les cellules cancéreuses de la prostate canine et que son expression est associée à une régulation de la synthèse des prostaglandines.

3.2 Objectifs

L'objectif général de la présente étude était de caractériser la régulation de la PGHS-2 dans une lignée cellulaire épithéliale provenant d'un adénocarcinome prostatique canin, la lignée CPA 1 (Eaton et coll., 1988). Les objectifs spécifiques étaient de cloner et de décrire la structure primaire de la PGHS-2 canine et d'étudier la régulation de son transcrit, de la protéine et de son activité dans les cellules CPA 1 *in vitro*.

4. ARTICLE

Boutemmine D, Bouchard N, Boerboom D, Jones HE, Goff AK, Doré M, Sirois J. 2002. Molecular Characterization of Canine Prostaglandin G/H Synthase-2 and Regulation in Prostatic Adenocarcinoma Cells *In Vitro*. *Endocrinology* (sous presse)

Molecular Characterization of Canine Prostaglandin G/H Synthase-2 and
Regulation in Prostatic Adenocarcinoma Cells *In Vitro**

Djamila Boutemmine†, Nadine Bouchard†, Derek Boerboom†‡,
Helen E. Jones¶, Alan K. Goff†, Monique Doré§ and Jean Sirois†f

†Centre de recherche en reproduction animale and §Département de pathologie
et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-
Hyacinthe, Québec,

Canada J2S 7C6, and the ¶Tenovus Center for Cancer Research,
Welsh School of Pharmacy, Cardiff University, Cardiff CF10 3XF, UK

Abbreviated title: PGHS-2 in prostatic adenocarcinoma cells

Key Words: Prostaglandin, prostaglandin G/H synthase-2, cyclooxygenase-2,
prostate cancer, prostatic adenocarcinoma

*This study was supported in part by Morris Animal Foundation Grant D00CA-47
(to M.D. and J.S.), Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant MT-
13190 (to J.S.), and Natural Sciences and Engineering Research Council of
Canada Grant 183964 (to M.D.). The nucleotide sequence reported in this paper
has been submitted to GenBank with accession number AY044905. ‡Supported
by a CIHR Doctoral Research Award. fSupported by a CIHR Investigator
Award.

Abstract

Induction of prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS-2), a key rate-limiting enzyme in the prostaglandin biosynthetic pathway, has been implicated in prostatic adenocarcinomas in humans and dogs *in vivo*, but the molecular control of PGHS-2 expression in prostate cancer remains poorly understood. Using the dog model, the specific objectives of this study were to clone and characterize canine PGHS-2, and to study the regulation of its transcript, protein and activity in a canine prostatic adenocarcinoma (CPA) cell line *in vitro*. The canine PGHS-2 complementary DNA (cDNA) was cloned by a combination of cDNA library screening and 5'-rapid amplification of cDNA ends, and shown to contain a 5'-untranslated region of 28 base pairs (bp), an open reading frame of 1815 bp and a 3'-untranslated region of 1655 bp. The open reading frame encodes a 604-amino acid protein that is 89% identical to the human homolog. The regulation of PGHS-2 protein and PGE₂ synthesis was studied in CPA cells cultured in the absence or presence of graded doses of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and lipopolysaccharides (LPS). Results from immunoblots, immunocytochemistry, and radioimmunoassays showed that PGHS-2 protein and PGE₂ were present at low levels in control cells, and were significantly induced after agonist treatment ($P < 0.05$), with PMA being the strongest inducer. Northern blot analyses also revealed a significant increase of PGHS-2 mRNA by PMA, TNF- α and LPS treatment ($P < 0.05$). Agonist-dependent induction of PGHS-2 mRNA was not dependent on new protein synthesis (co-incubation with cycloheximide; 10 μ g/ml) but was blocked by

transcription inhibitor actinomycin D (5 $\mu\text{g/ml}$), suggesting that PGHS-2 acts an immediate early-response gene in prostatic epithelial cells. Thus, this study characterizes for the first time the structure of canine PGHS-2 and provides an *in vitro* model to unravel the molecular basis of PGHS-2 expression in prostatic adenocarcinomas.

Introduction

Prostate cancer is the most frequent cancer in men in the Western world (1), with an estimated 198,100 new cases in the United States alone in 2001 (2). It is a locally invasive and insidious disease that metastasizes to distant tissues, preferentially to lymph nodes and bones (3). Despite its high incidence, very few risk factors have been identified and include primarily age, race and family history (4-6). Environmental factors have also been implicated in some populations, and dietary fat has been the focus of several investigations, although its causal relationship remains questioned (7, 8). Precursor lesions of prostate cancer have been identified, with prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) being the best characterized precancerous lesion (9, 10). Different animal models have been used for studying prostatic carcinogenesis, including recent transgenic and reconstitution models in mice and experimentally-induced models in rodents (11-13). However, besides man, the dog is the only species that frequently develops spontaneous prostate cancer (14). Interestingly, many aspects of the disease are common to both species. As observed in men, adenocarcinoma of the prostate in dogs affects older subjects, is associated with high-grade PIN, and is a locally invasive and malignant disease with a propensity for skeletal metastasis (15, 16).

Increased synthesis of prostaglandins has been implicated in the development and progression of various cancers because of their role in cell proliferation, apoptosis, immune surveillance and xenobiotic metabolism (17-19). The first rate-limiting step in the biosynthesis of all prostaglandins from

arachidonic acid is catalyzed by the enzyme prostaglandin G/H synthase (PGHS, also known as cyclooxygenase or COX) (20, 21). The enzyme has two sequential catalytic activities, a cyclooxygenase and a peroxidase activity, that ultimately produce PGH_2 , a common precursor for the synthesis of all prostaglandins. Two isoforms of PGHS have been identified, PGHS-1 and PGHS-2 (20, 21). Although both isoforms share similar enzymatic functions, they differ markedly in their pattern of expression. PGHS-1 is present in a wide variety of tissues and is often referred to as the constitutive isoform involved in housekeeping functions, whereas PGHS-2 is generally undetectable in most tissues but can be induced by a variety of agonists, and is referred to as the inducible isoform (20, 21). Increased expression of PGHS-2, but not of PGHS-1, has been associated with various cancers in humans and animals (18, 22), and a cause-effect relationship between PGHS-2 expression and cancer was best supported in the Apc mouse model of human familial adenomatous polyposis in which a null mutation of the PGHS-2 gene was shown to cause an 86% reduction in the number of intestinal polyps (23).

The first evidence of an induction of PGHS-2 in prostate cancer originated from a study in dogs in which 75% of prostatic adenocarcinomas were shown to contain epithelial cells expressing PGHS-2, in contrast to normal prostates where no PGHS-2 was detected (24). Subsequently, a number of recent studies provided evidence for an increased expression of PGHS-2 in human prostate cancer (25-29). The implication of PGHS-2 and prostaglandins in the development of prostate cancer is also supported by the inhibitory effects of

nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), which block prostaglandin synthesis by inhibiting PGHS enzymes, on prostatic carcinogenesis (30-34). NSAIDs and particularly the new generation of PGHS-2 selective NSAIDs have recently been proposed as chemopreventive agents (18, 19). Although the precise roles of PGHS-2 and prostaglandin synthesis in prostatic carcinogenesis remain to be fully characterized, mounting evidence suggest that PGs could act by promoting cell proliferation and preventing apoptosis, by stimulating tumor cell invasiveness, and by promoting angiogenesis (35, 36). It is also thought that the oxidative activity generated by the PGHS-2 enzyme could contribute to DNA oxidation and be involved in the induction of mutations (37). Thus, although the implication and role of PGHS-2 and prostaglandin synthesis in prostate cancer are clearly emerging, the molecular control of PGHS-2 expression in prostate cancer cells remains poorly understood. The general objective of the present study was to characterize the regulation of PGHS-2 in a well-characterized epithelial cell line derived from a canine prostatic adenocarcinoma (CPA; 38). The specific objectives were to clone and describe the primary structure of canine PGHS-2, and to study the regulation of its transcript, protein and activity in CPA cells *in vitro*.

Materials and Methods

Materials

(Minneapolis, MN); phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), lipopolysaccharides (LPS), diethyldithiocarbamic acid (DEDTC), actinomycin D,

cycloheximide, diaminobenzidine tetrahydrochloride and octyl β -D-glucopyranoside (octyl glucoside) were obtained from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO); [125 I]Protein A and Biotrans nylon membranes (0.2 μ m) were purchased from ICN Pharmaceuticals (Montréal, Québec, Canada); nitrocellulose membranes (0.45 μ m) was obtained from Schleicher & Schuell (Kneene, NH); Rainbow molecular weight markers and Kodak film X-OMAT AR were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie D'Urfé, Québec, Canada); PGE₂ antiserum was obtained from Assay Designs Inc. (Ann Arbor, MI); QuikHyb hybridization solution and the ExAssist/SOLR system were purchased from Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA); [α - 32 P]dCTP was obtained from Mandel Scientific-New England Nuclear Life Science Products (Mississauga, Ontario, Canada); Prime-a-Gene labeling system, 5'-RACE System, pGEM-T easy Vector System I were purchased from Promega (Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada); TRIzol total RNA isolation reagent, 1-kb DNA ladder, synthetic oligonucleotides, bovine fetal serum, tissue culture media and additives were obtained from Invitrogen Canada Inc. (Burlington, Ontario, Canada); Bio-Rad Protein Assay and all electrophoretic reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA); Vectastain ABC kit was purchased from Vector Laboratories (Burlingame, CA); cell scrapers, Lab-Tek II 8-chamber glass slides and all tissue culture plasticware were obtained from Corning-Costar (Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada).

Cell Culture

The CPA 1 cell line, a previously characterized epithelial cell line derived from a canine prostatic adenocarcinoma, was used (38). Cells were cultured at 37 C in 95% air 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagles medium (DMEM) supplemented with penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 µg/ml), Fungizone (2.5 µg/ml) and 10% fetal bovine serum (FBS), and were passaged by exposure to trypsin/EDTA (0.05/0.02% w/v) in Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS). CPA cells were cultured for variable lengths of time in the absence or presence of PMA (0.1-100 ng/ml), TNF α (0.1-100 ng/ml) and LPS (0.1-100 ng/ml), as described in each experiment, and co-incubation with the transcription inhibitor actinomycin D (5 µg/ml) or the translation inhibitor cycloheximide (10 µg/ml) was performed in some studies. For all experiments, cells were grown to 70-80% confluency and then cultured in serum free media for 24 h prior to agonist treatment. Cells were cultured in tissue culture flasks (75 cm²) for studies involving extraction of protein and RNA, and in 24-well culture dishes for all experiments investigating PGE₂ production *in vitro*. At the end of the culture period, cells were recovered with a cell scraper, pelleted by centrifugation at 1000 X *g* for 5 min and stored at -70 C until used for analysis. Similarly, media samples were collected and frozen at -20 C until assayed.

Solubilized Cell Extracts and Immunoblot Analysis

Solubilized cell extracts were prepared as previously described (24). 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 was determined by the method of Bradford (Bio-Rad Protein Assay) (39). Proteins (50 µg) of cell extracts were resolved by one-dimensional SDS-PAGE, and electrophoretically transferred onto nitrocellulose filters. Filters were incubated with a selective anti-PGHS-2 antibody (MF243), and ¹²⁵I-labeled protein A was used to visualize immunopositive proteins as described (24). Filters were exposed to X-ray film at -70 C.

Prostaglandin E₂ Radioimmunoassay

Concentrations of PGE₂ were measured directly in culture media, as previously described (40). The antiserum was purchased from Assay Designs Inc. (Ann Arbor, MI); its cross-reactivities against PGE₁, PGF_{1α}, PGF_{2α}, and 6-keto PGF_{1α} were 70%, 1.4%, 0.7% and 0.6%, respectively. The sensitivity of the assay was 40 pg/ml, and the intra- and interassay coefficients of variation were 8.2% and 10.8%, respectively. At the end of the culture period, the total amount of protein per well was determined by the method of Bradford (Bio-Rad Protein Assay) (39), and concentrations of PGE₂ were expressed as pg per µg of protein.

Immunocytochemistry

CPA cells were cultured in 8-chamber glass slides (Lab-Tek II) in DMEM supplemented with 10% FBS until they were 70-80% confluent, as described above. After 24 h of serum starvation, cells were cultured for 24 h in the absence or presence of PMA (10 ng/ml) or TNF α (50 ng/ml). After agonist treatment, cells were fixed with 95% ethanol/5% acetic acid, and immunocytochemical staining for PGHS enzymes was performed using the Vectastain avidin:biotin complex (ABC kit), as previously described (24). Briefly, endogenous peroxidase was quenched by incubating the slides in 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min. After rinsing in PBS for 15 min, sections were incubated with diluted normal goat serum for 20 min at room temperature. A PGHS-2 selective antibody (MF243; diluted at 1:1000) was applied, and slides were incubated overnight at 4 C. Controls were incubated with PBS alone or with a PGHS-1 selective antibody (8223; diluted at 1:100) (24). After rinsing in PBS for 10 min, a biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:222 dilution) was applied, and slides were incubated for 45 min at room temperature. They were washed in PBS for 10 min, and incubated with the avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase H reagents (Vectastain ABC kit) for 45 min at room temperature. After a 10 min PBS wash, the reaction was revealed using diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) as the peroxidase substrate. Sections were counterstained with Gill's hematoxylin stain and mounted.

Cloning and Characterization of Canine PGHS-2

The complete coding region of the canine PGHS-2 transcript was characterized using a two-step cloning strategy. A canine spleen cDNA library (Dr. R Nash, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) was screened with a 5' 1.2-kb *EcoRI* fragment of the mouse PGHS-2 cDNA (41). The probe was labeled with [α -³²P]dCTP using the Prime-a-Gene labeling system (Promega) to a final specific activity greater than 1×10^8 cpm/ μ g DNA. Approximately 300,000 phage plaques were screened, and hybridization was performed at 55 C with QuikHyb hybridization solution (Stratagene). Eight positive clones were plaque purified through secondary and tertiary screenings, and pBluescript phagemids containing the cloned DNA insert were excised *in vivo* with the Ex-Assist/SOLR system (Stratagene). DNA sequencing was performed using an ABI autosequencer (Applied Biosystems, Foster City, Ca). Because the clones obtained by library screening were incomplete at the 5'-end, the 5'-RACE System for rapid amplification of cDNA ends, Version 2.0 kit (Invitrogen) was used as directed by the manufacturer. Reverse transcription was performed using 5 μ g of total RNA isolated from CPA cells treated for 6 h with PMA (10 ng/ml) and the canine PGHS-2 anti-sense primer 5'-CATAATTGTATTTTCGCAG-3'. After Tdt tailing, the first PCR reaction was performed with the sense abridged anchor primer (5'-RACE system, Invitrogen) and the canine PGHS-2 anti-sense primer 5'-AATGTTCCAGACTCCCTTGAAGTG-3', and the second nested PCR reaction was performed with the sense universal amplification primer (5'-RACE system,

Invitrogen) and the canine PGHS-2 anti-sense primer 5'-GTATGTAGTGTACTGTATTTGGAGTG-3'. PCR reactions were performed with *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), using 35 (first reaction) or 30 (second reaction) cycles of 94 C for 30 sec, 55 C for 1 min, and 72 C for 2 min, with a final 7-min extension step at 72 C. The largest 5'-RACE products were isolated, subcloned into pGEM-T easy (Promega) and sequenced.

RNA Extraction and Northern blot

Total RNA was extracted from cells using TRIzol (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. For Northern blot analysis, RNA samples (10 µg) were denatured at 55 C for 15 min in 45% formamide, 5.4% formaldehyde, separated by electrophoresis in a 1% agarose gel and transferred onto a nylon membrane as described (40). The membrane was first hybridized to a 1.4-kb fragment of the canine PGHS-2 cDNA using the QuikHyb solution (Stratagene). After stripping the radioactivity with 0.1% SSC-0.1% SDS for 30 min at 100 C, the same blot was hybridized with the rat elongation factor Tu (EFTu) cDNA as a control gene for RNA loading (42). Each probe was labeled with the [α -³²P]dCTP using the Prime-a-Gene labeling system (Promega) to a final specific activity greater than 1×10^8 cpm/µg DNA, and membranes were exposed to film at -70 C.

Statistical analysis

Relative levels of PGHS-2 mRNA was quantified by densitometric analysis of autoradiographic bands using the ImageQuant software version 1.1 (Molecular Dynamics). The EFTu signal was also quantified and used to normalize results, and data were expressed as ratios of PGHS-2 to EFTu. One-way ANOVA was used to test the effect of time of treatment or dose of agonist on relative levels of PGHS-2 transcripts in CPA cells and on PGE₂ production *in vitro*. When ANOVAs indicated significant differences ($P < 0.05$), the Dunnett's test was used for multiple comparisons with respective controls. Statistical analyses were performed using the computer program JMP (SAS Institute, Carry, NC).

Results

Regulation of PGHS-2 protein and PGE₂ synthesis in CPA cells

To determine whether PGHS-2 is expressed in CPA cells *in vitro*, the regulation of PGHS-2 protein and PGE₂ production was studied in cultures of CPA cells stimulated with graded doses of PMA, TNF- α and LPS. Results showed that PGHS-2 protein ($M_r = 72,000$) was expressed at low levels, and that PGE₂ was produced *in vitro* (2.8 ± 0.3 pg/ μ g protein) by CPA cells cultured in the absence of agonist (Fig.1; panel A, 0 ng/ml PMA). An induction in PGHS-2 protein expression was observed after agonist treatment; however the pattern of induction differed amongst agonists (Fig. 1). Levels of PGHS-2 protein were maximal with 10 ng/ml and 50 ng/ml of PMA and TNF- α , respectively, whereas no marked difference was observed with the different doses of LPS tested.

PGE₂ production was also significantly increased after agonist treatment ($P < 0.05$), and results paralleled for the most part those observed for PGHS-2 protein as PMA and LPS appeared as the strongest and weakest inducers of PGE₂ production, respectively (Fig. 1).

To better characterize the agonist-dependent induction of PGHS-2 protein in CPA cells *in vitro*, cells were cultured in the absence or presence of PMA (10 ng/ml), TNF- α (50 ng/ml) and LPS (10 ng/ml) for 1, 3, 6, 12 and 24 h. Results showed a progressive time-dependent increase in PGHS-2 protein in cultures stimulated with PMA and TNF- α , with maximal induction observed at 12 and 24 h of stimulation (Fig. 2B and C). In contrast, PGHS-2 was modestly induced after 3 h of LPS treatment, and no marked difference was noted thereafter (Fig. 2D). A time-dependent accumulation of PGE₂ in culture media was observed with all agonists, with maximal levels observed at 24 h of culture (Fig. 2). Concentrations of PGE₂ increased from 2.2 ± 0.5 to 393.1 ± 60.5 , 0.7 ± 0.3 to 266.2 ± 43.2 and 1.4 ± 0.4 to 32.2 ± 4.6 pg/ μ g protein between 1 and 24 h of culture with PMA, TNF- α , and LPS, respectively ($P < 0.05$). Levels of PGHS-2 protein remained relatively low at all time points in control cells (Fig. 2A) as compared to agonist-stimulated cells, but a significant increase in concentrations of PGE₂ also occurred between 1 and 24 h in cultures of control cells (from 1.2 ± 0.4 to 4.5 ± 0.5 pg/ μ g protein, respectively; $P < 0.05$).

To characterize the pattern of PGHS-2 protein expression in CPA cells *in situ*, immunocytochemistry was performed on cells cultured in the absence or presence of PMA (10 ng/ml) and TNF- α (50 ng/ml) for 24 h. Immunoreactive

PGHS-2 was observed in control cells (Fig. 3A and B), but levels were markedly increased after PMA (Fig. 3C and D) and TNF- α treatment (Fig. 3F). Immunostaining with a PGHS-1 selective antibody revealed very low or negligible reactivity in control cells (data not shown) and no induction after PMA (Fig. 3E) or TNF α treatment (data not shown).

Cloning and characterization of canine PGHS-2

To clone the canine PGHS-2 cDNA, a spleen cDNA library was screened with a 5'-fragment of the mouse PGHS-2 cDNA probe (41). A total of eight positive clones isolated from an initial screen of approximately 300,000 plaques were purified and characterized by restriction mapping and partial DNA sequencing. Two of these clones (clones 1S-4 and 2S-5) that overlapped were sequenced on both strands and shown to represent the near full-length canine PGHS-2. The missing 5'-end of the cDNA was obtained by 5'-RACE. Collectively, these results showed that the canine PGHS-2 cDNA contains a 5'-untranslated region of 28 bp, an open reading frame of 1815 bp (including the stop codon) and a long 3'-untranslated region of 1655 bp containing multiple repeats of the Shaw-Kamen sequence 5'-ATTTA-3' (n = 10; Fig. 4).

The amino acid sequence of canine PGHS-2 was deduced from the coding region of the cDNA, and compared with the human ortholog (43) (Fig. 5). The canine PGHS-2 coding region encodes a 604-amino acid protein, which is identical in length to that of human and all other known mammalian PGHS-2 proteins except for ovine PGHS-2 that has only 603 residues (44). Comparisons

between canine and human PGHS-2 revealed an 89% identity at the amino acid level, with all putative structural and functional domains implicated in PGHS-2 function conserved in the canine protein (Fig. 5).

Regulation of PGHS-2 mRNA in canine prostatic adenocarcinoma cells

To investigate whether the agonist-dependent regulation of PGHS-2 protein in CPA cells was associated with the induction of transcripts, Northern blot analyses were performed on total RNA extracted from cells cultured for 6 h in the absence or presence of graded doses of PMA, TNF- α and LPS. Results showed a marked regulation of steady state levels of PGHS-2 transcripts in CPA cells after agonist treatment ($P < 0.05$). PGHS-2 mRNA was not detected in cells cultured in the absence of agonist (Fig. 6A; 0 ng/ml), but a progressive increase in transcript levels was observed after PMA and TNF- α treatment. When results from three independent experiments were expressed as ratios of PGHS-2 to EFTu (elongation factor Tu; control gene), maximal induction was obtained with 10 ng/ml of PMA and 50 ng/ml of TNF- α (Fig. 6), in keeping with results obtained for the PGHS-2 protein (Fig. 1). In contrast, levels of PGHS-2 mRNA remained relatively constant after LPS treatment (Fig. 6), as previously observed for the PGHS-2 protein (Fig. 1).

To provide a better characterization of PGHS-2 mRNA induction in CPA cells *in vitro*, cells were cultured in the absence or presence of PMA (10 ng/ml), TNF- α (50 ng/ml) and LPS (10 ng/ml) for 1, 3, 6, 12 and 24 h. No PGHS-2 transcript was detected in control cells throughout the culture period (Fig. 7A).

Levels of PGHS-2 mRNA were significantly induced by 1 h of PMA stimulation ($P < 0.05$) (Fig 7B). Induction of PGHS-2 transcripts was also observed after 1 or 3 h of TNF- α and LPS treatments, but the induction appeared more modest than with PMA and because of inherent variability amongst replicate experiments, significance was reached only after 3 and 12 h of LPS treatment ($P < 0.05$) (Fig. 7C and D).

Transcriptional- and translational-dependent regulation of canine PGHS-2

To determine whether the agonist-dependent induction of PGHS-2 in CPA cells was dependent on transcription and translation events, the transcription inhibitor actinomycin D and the translation inhibitor cycloheximide were added to cells cultured in the presence or absence of PMA, TNF- α and LPS. Results from immunoblot analyses showed an induction of PGHS-2 protein by all three agonists when compared to control cells, with PMA being the strongest inducer, as expected (Fig. 8A). However, co-incubation with actinomycin D and cycloheximide blocked the protein induction by all three agonists, but had not effect on basal levels observed in control cells (Fig. 8A). Northern blot analyses showed that the transcription inhibitor blocked the PMA-, TNF- α - and LPS-dependent increase in PGHS-2 mRNA (Fig. 8B). In contrast, the translation inhibitor did not block this increase but rather caused a further rise (i.e. superinduction) in transcript levels (Fig. 8B). This effect was also observed in control cells in which low levels of PGHS-2 mRNA were detected in cells treated

with cycloheximide, as revealed by a longer exposure of the blot presented in Figure 8B (data not shown).

Discussion

The present study characterizes for the first time the regulation of PGHS-2 and prostaglandin synthesis in an epithelial cell line derived from a canine prostatic adenocarcinoma (38). Other than man, the dog is the only known mammal to suffer from spontaneous age-dependent prostatic diseases such as benign prostatic hyperplasia and prostate cancer (15), thus providing an attractive model to study prostate carcinogenesis. Interestingly, prostate cancer in dogs bears numerous similarities to the human disease (15, 16) and, as companion animals, dogs may be susceptible to the same environmental factors that are thought to be risk factors of prostate cancer in humans. An additional similarity between dog and human prostate cancer was recently uncovered when the induction of the PGHS-2 in canine prostatic adenocarcinoma *in vivo* (24) was observed in humans (25-29). Numerous experimental and epidemiological studies have provided evidence for a role of PGHS-2 and prostaglandins in carcinogenesis in humans and animals (17-19, 22, 23, 45); however, the molecular control of PGHS-2 expression in prostate tumor cells remains poorly characterized.

Our results demonstrate that the expression of PGHS-2 in canine prostatic carcinoma cells can be markedly upregulated in a dose- and time-dependent manner using agonists working through different transduction pathways. The

strongest induction of PGHS-2 was observed following treatment with the tumor promoter PMA, an activator of protein kinase C (PKC), and this induction was accompanied by a significant increase in PGE₂ production. PMA has been shown to enhance the transcription of PGHS-2 in normal epithelial cells such as human mammary and oral epithelial cells (46, 47) as well as in neoplastic cells such as human breast cancer cell lines (48). Interestingly, certain compounds displaying anti-inflammatory and chemopreventive properties, such as resveratrol and ursolic acid, have recently been shown to suppress the activation of PGHS-2 gene expression in PMA-treated human mammary and oral epithelial cells through the inhibition of the PKC signal transduction pathway (47, 49).

The cytokine TNF- α was able to significantly increase PGHS-2 expression in canine prostatic tumor cells. Suganuma *et al.* (50) recently demonstrated that TNF- α is a critical cytokine involved in tumor promotion in mouse skin, and suggested that TNF- α could also play a role in human carcinogenesis. TNF- α is known to stimulate immediate early genes, and is recognized as a strong inducer of PGHS-2 gene expression in various cell types, including human prostatic cells (18, 51). Indeed, a recent report demonstrated that TNF- α increases PGHS-2 protein levels in tumoral human prostatic cell lines (51). Interestingly, the authors characterized in the same study the level of PGHS-2 expression in three normal and three cancerous human prostatic cell lines, and found very high levels of PGHS-2 mRNA and protein in one normal cell line and low levels in all other normal and neoplastic cell lines. These results are surprising considering that, *in vivo*, PGHS-2 is undetectable or present in very low amount in normal prostate

but is highly expressed in human prostate cancer (25-29). In the dog, where there is also a marked induction of PGHS-2 in prostatic adenocarcinoma *in vivo* (24), we recently found that PGHS-2 expression in an epithelial cell line derived from a normal canine prostate (52) was higher (data not shown) than that observed in the untreated tumor cells (CPA cells in this study). Collectively, these observations suggest that, both in humans and dogs, the control of PGHS-2 expression in some prostatic epithelial cells lines may not accurately reflect the regulation observed *in vivo*.

High concentrations of PGE₂ have recently been found in the tissues of canine prostatic carcinomas (45). The PMA- and TNF- α -dependent induction of PGHS-2 in CPA cells was also associated with a marked increase in PGE₂ production *in vitro*. Several pieces of evidence support a role for PGE₂ at different steps of the carcinogenesis process in the prostate. Liu *et al.* recently reported that PGE₂ production could be involved in tumor angiogenesis in the prostate by upregulating the expression of vascular endothelial growth factor, a key factor in the promotion of angiogenesis in malignancy (32, 53). PGE₂ has also been implicated as a potential mediator in the process of degradation of the basement membrane by prostatic tumor cells since selective inhibition of PGHS-2 reduced *in vitro* invasiveness of prostatic cells, and this inhibition could be reversed by PGE₂ (54). Additionally, PGE₂ was shown to significantly stimulate the growth of human prostatic carcinoma cells, and is possibly implicated in the induction of the immediate early gene c-fos in prostate cancer cells (55, 56). PGE₂ is also thought to play a role in the apoptotic process as studies have

reported that selective inhibition of PGHS-2 in human prostate cancer cells induces apoptosis (33, 34).

Of the three agonists used, LPS was the weakest inducer of PGE₂ production in prostatic cancer cells. LPS released from the surface of the cell membrane of Gram-negative bacteria can be found in the circulation during systemic states such as endotoxemia. Although few studies have looked at the direct effect of LPS on epithelial cells, a report by Kojima *et al.* (57) recently found that LPS was a potent regulator of PGHS-2 expression and PGE₂ secretion in intestinal cancerous cells *in vitro*. Our results with canine prostatic epithelial cells suggest that the potency of LPS to regulate prostaglandin synthesis may vary depending on the origin of epithelial cells. Results from the present study also suggest that the induction of PGHS-2 mRNA by PMA, TNF- α and LPS in CPA cells is dependent on transcriptional events but not on protein synthesis, indicating that the complement of transcription factors needed for PGHS-2 gene induction is already present in cells prior to agonist stimulation and that the activation of these factors likely involves post-transcriptional or post-translational modifications. The cycloheximide-dependent superinduction of PGHS-2 transcript following agonist treatment is in keeping with similar results observed in most cell types where PGHS-2 is an immediate early response-gene (58, 59). One notable exception remains the induction of PGHS-2 by gonadotropins in granulosa cells which is clearly dependent on transcription and translation (60).

Lastly, this study is the first to report the cloning and characterization of canine PGHS-2, and comparative analyses further underscore the highly conserved nature of PGHS-2 across species. The length of the canine PGHS-2 protein, 604 amino acids, is identical to that of other cloned mammalian orthologs, except for the ovine enzyme that is one residue shorter (44). The deduced amino acid sequence of the canine enzyme is very similar to that of other species, being more than 88% identical to other mammalian PGHS-2 (reviewed in 40). Importantly, all structural and functional domains putatively involved in PGHS-2 activity are present in the canine enzyme, including four N-linked glycosylation, a transmembrane domain, heme-coordinating histidines 295 and 374, the cyclooxygenase active-site tyrosine 371 and the aspirin acetylation-site serine 516 (40, 43, 44). The presence of multiple copies of the Shaw-Kamen sequence 5'-ATTTA-3', which corresponds to a 5'-AUUUA-3' motif in the transcript, in the 3'-untranslated region of the canine PGHS-2 cDNA is also a conserved structural feature in other species (40, 43, 44). This motif has been described as an instability determinant of rapidly degraded mRNAs (61), and is in keeping with the unstable nature of the PGHS-2 transcripts.

In summary, this is the first report to characterize the molecular structure of canine PGHS-2, and to demonstrate the regulation of the enzyme in a cell line derived from a canine prostatic adenocarcinoma. Based on numerous similarities observed between human and canine prostate cancer, our study provides an interesting model to further investigate the fine molecular control of prostaglandin synthesis in prostate cancer. Moreover, the dog model could

provide unique advantages to test the chemopreventive or therapeutic efficacy of prostaglandin synthesis inhibitors, considering that its relatively large size, as compared to rodents, enables the use of various imaging and diagnostic procedures.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. D.L. Simmons (Brigham Young University) for the mouse PGHS-2 cDNA, Dr. Richard Nash (Fred Hutchinson Cancer Research Center) for the canine spleen cDNA library, and Dr. R. Levine (Cornell University) for the rat EFTu cDNA.

References

1. **Lalani EN, Laniado ME, Abel PD** 1997 Molecular and cellular biology of prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 16:29-66
2. **Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M** 2001 Cancer statistics 2001. *CA Cancer J Clin* 51:15-36
3. **Jacobs SC** 1983 Spread of prostatic cancer to bone. *Urology* 21:337-344
4. **Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J** 1997 Cancer incidence in five continents. Vol. VII. Lyon (France): IARC Sci Publ No. 143; p.316
5. **Merrill RM, Potosky AL, Feuer EJ** 1996 Changing trends in U.S. prostate cancer incidence rates. *J Natl Cancer Inst* 88:1683-1685
6. **Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC** 1990 Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 17:337-347
7. **Xue L, Yang K, Newmark H, Lipkin M** 1997 Induced hyperproliferation in epithelial cells of mouse prostate by a Western-style diet. *Carcinogenesis* 18:995-999
8. **Kolonel LN, Nomura AMY, Cooney RV** 1999 Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst* 91:414-428
9. **Bostwick DG** 1995 High grade prostatic intraepithelial neoplasia: The most likely precursor of prostate cancer. *Cancer* 75:1823-1836
10. **Bostwick DG, Pacelli A, Lopez-Beltran A** 1996 Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 29:117-143

11. **Lucia MS, Bostwick DG, Bosland M, Cockett ATK, Knapp DW, Leav I, Pollard M, Rinker-Schaeffer C, Shirai T, Watkins B** 1998 Rodent models of prostate cancer. *Prostate* 36: 49-55
12. **Green JE, Greenberg NM, Ashendel CL, Barrett JC, Boone C, Getzenberg RH, Henkin J, Matusik R, Janus TJ, Scher HI** 1998 Transgenic and reconstitution models of prostate cancer. *Prostate* 36:59-63
13. **Cohen MB, Padarathsingh M, Hendrix MJC** 2000 Experimental models of prostate cancer research. *Am J Pathol* 156:355-358
14. **Rivenson A, Silverman J** 1979 The prostatic carcinoma in laboratory animals: a bibliography survey from 1900 to 1977. *Invest Urol* 16:468-472
15. **Maini A, Archer C, Wang CY, Haas GP** 1997 Comparative pathology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *In Vivo* 11:293-299
16. **Cornell KK, Bostwick DG, Cooley DM, Hall G, Jay Harvey H, Hendrick MJ, Pauli BU, Render JA, Stoica G, Sweet DC, Waters DJ** 2000 Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinomas: a retrospective analysis of 76 cases. *Prostate* 45:173-183
17. **Badawi AF** 2000 The role of prostaglandin synthesis in prostate cancer. *BJU Int* 85:451-462
18. **Fosslien E** 2000 Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 37:431-502
19. **Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ** 1997 Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216:201-210

20. **Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM** 2000 Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145-182
21. **Vane JR, Bakhle YS, Botting RM** 1998 Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120
22. **de Almeida EM, Piche C, Sirois J, Dore M** 2001 Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem* 49:867-876
23. **Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM** 1996 Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87:803-809
24. **Tremblay C, Dore M, Bochsler PN, Sirois J** 1999 Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 91:1398-1403
25. **Kirschenbaum A, Klausner AP, Lee R, Unger P, Yao S, Liu XH, Levine AC** 2000 Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate. *Urology* 56:671-676
26. **Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H** 2000 Overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 42:73-78
27. **Yoshimura R, Sano H, Masuda C, Kawamura M, Tsubouchi Y, Chargui J, Yoshimura N, Hla T, Wada S** 2000 Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer* 89:589-596

28. **Tanji N, Kikugawa T, Yokoyama M** 2000 Immunohistochemical study of cyclooxygenases in prostatic adenocarcinoma; relationship to apoptosis and Bcl-2 protein expression. *Anticancer Res* 20:2313-2319
29. **Uotila P, Valve E, Martikainen P, Nevalainen M, Nurmi M, Harkonen P** 2001 Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer. *Urol Res* 29:23-28
30. **tum Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno SR** 2000 Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate or cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 60:4629-4637
31. **Wechter WJ, Leipold DD, Murray ED Jr, Quiggle D, McCracken JD, Barrios RS, Greenberg NM** 2000 E-7869 (R-flurbiprofen) inhibits progression of prostate cancer in the TRAMP mouse. *Cancer Res* 60:2203-2208
32. **Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Lee R, Holland JF, Levine AC** 2000 Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. *J Urol* 164:820-825
33. **Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC** 1998 NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 58:4245-49
34. **Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS** 2000 The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt

- activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 275:11397-11403
35. **Tsuji M, Kawano S, DuBois RN** 1997 Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3336-3340
 36. **Gately S** 2000 The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 19:19-27
 37. **Nikolic D, van Breemen RB** 2001 DNA oxidation induced by cyclooxygenase-2. *Chem Res Toxicol.* 14:351-354
 38. **Eaton CL, Pierrepoint CG** 1988 Growth of a spontaneous canine prostatic adenocarcinoma in vivo and in vitro: isolation and characterization of a neoplastic prostatic epithelial cell line, CPA 1. *Prostate* 12:129-143
 39. **Bradford MM** 1976 A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254
 40. **Liu J, Antaya M, 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
 41. **Simmons DL, Xie W, Chipman JG, Evett JE** 1992 Multiple cyclooxygenases: cloning of a mitogen-inducible form: In: Martyn Bailey J (ed), *Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins and PAF*. New York: Plenum Press; 67-78

42. **Levine RA, Serdy M, Guo L, Holzschu D** 1993 Elongation factor Tu as a control gene for mRNA analysis of lung development and other differentiation and growth regulated systems. *Acids Res* 21:4426
43. **Hla T, Neilson K** 1992 Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7384-7388
44. **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
45. **Mohammed SI, Coffman K, Glickman NW, Hayek MG, Waters DJ, Schlittler D, DeNicola DB, Knapp DW** 2001 Prostaglandin E2 concentrations in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64:1-4
46. **Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, Inoue H, Dannenberg AJ** 1997 Retinoids suppress phorbol ester-mediated induction of cyclooxygenase-2. *Cancer Res* 57:1081-1085
47. **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
48. **Liu XH, Rose DP** 1996 Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56:5125-5127

49. **Subbaramaiah K, Michaluart P, Sporn MB, Dannenberg AJ** 2000 Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 60:2399-2404
50. **Suganuma M, Okabe S, Marino MW, Sakai A, Sueoka E, Fukjiki H** 1999 Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res* 59:4516-4518
51. **Subbarayan V, Sabichi AL, Llansa N, Lippman SM, Menter DG** 2001 Differential expression of cyclooxygenase-2 and its regulation by tumor necrosis factor- α in normal and malignant prostate cells. *Cancer Res* 61:2720-2726
52. **Eaton CL, Pierrepoint CG** 1982 Epithelial and fibroblastoid cell lines derived from the normal canine prostate. I. Separation and characterization of epithelial and stromal components. *Prostate* 3:277-290
53. **Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Stearns ME, Holland JF, Claffey K, Levine AC** 1999 Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clin Exp Metastasis* 17:687-694
54. **Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak NJ, Patierno SR** 2000 Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 60:4629-4637

55. **Chen Y, Hughes-Fulford M** 2000 Prostaglandin E2 and the protein kinase A pathway mediate arachidonic acid induction of c-fos in human prostate cancer cells. *Br J Cancer* 82:2000-2006
56. **Hughes-Fulford M, Chen Y, Tjandrawinata RR** 2001 Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis* 22:701-707
57. **Kojima M, Morisaki T, Izuhara K, Uchiyama A, Matsunari Y, Katano M, Tanaka M** 2000 Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor- κ B activation. *Oncogene* 19:1225-1231
58. **Herschman HR** 1996 Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1299:125-140
59. **Bartlett SR, Sawdy R, Mann GE** 1999 Induction of cyclooxygenase-2 expression in human myometrial smooth muscle cells by interleukin-1beta: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Physiol* 520:399-406
60. **Wong WY, DeWitt DL, Smith WL, Richards JS** 1989 Rapid induction of prostaglandin endoperoxide synthase in rat preovulatory follicles by luteinizing hormone and cAMP is blocked by inhibitors of transcription and translation. *Mol Endocrinol* 3:1714-1723
61. **Chen CY, Shyu AB** 1994 Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Mol Cell Biol* 14:8471-8482

Fig. 1. Dose-dependent induction of PGHS-2 protein and PGE₂ synthesis by PMA, TNF- α and LPS in CPA cells. CPA cells were cultured in the absence of agonist (A; 0 ng/ml) or presence of graded doses of PMA (A; 0.1-100 ng/ml), TNF- α (B; 0.1-100 ng/ml) and LPS (C; 0.1-100 ng/ml) as described in *Materials and Methods*. Cell extracts were prepared from cultures of canine cells after 12 h of agonist stimulation, and proteins (50 μ g/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and immunoblotting techniques. Results from a representative experiment (*autoradiograms*) are shown; the control culture (0 ng/ml) shown in *panel A* is also the no treatment control for *panels B and C*. Similar results were obtained from two other independent experiments. Markers on the right indicate migration of intact PGHS-2 protein ($M_r = 72,000$). Concentrations of PGE₂ in culture medium were determined after 24 h of agonist stimulation. Results are presented as pg of PGE₂ per μ g of cellular protein (mean \pm SEM of duplicate cultures from three independent experiments). Bars marked with an asterisk are significantly different from controls ($P < 0.05$).

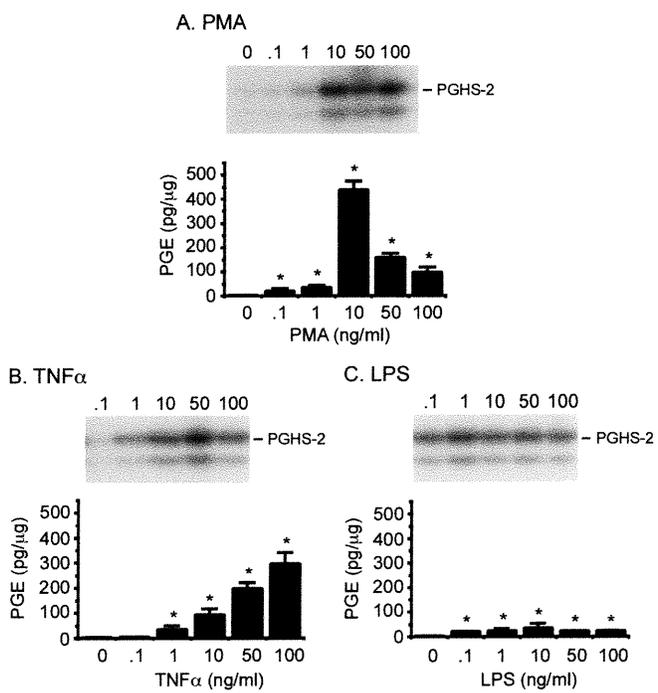


Fig. 2. Time-dependent induction of PGHS-2 protein and PGE₂ synthesis by PMA, TNF- α and LPS in CPA. CPA cells were cultured for 1, 3, 6, 12 and 24 h in absence (A) or presence of PMA (B; 10 ng/ml), TNF- α (C; 50 ng/ml) and LPS (D; 10 ng/ml) as described in *Materials and Methods*. Cell extracts were prepared, and proteins (50 μ g/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and immunoblotting techniques. A representative blot is shown for each agonist; similar results were obtained from two other independent experiments. Markers on the right indicate migration of intact PGHS-2 protein ($M_r = 72,000$). Concentrations of PGE₂ in culture medium were determined by specific radioimmunoassays. Results are presented as pg of PGE₂ per μ g of cellular protein (mean \pm SEM of duplicate cultures from three independent experiments). Bars marked with an asterisk are significantly different from the 0 h time point ($P < 0.05$).

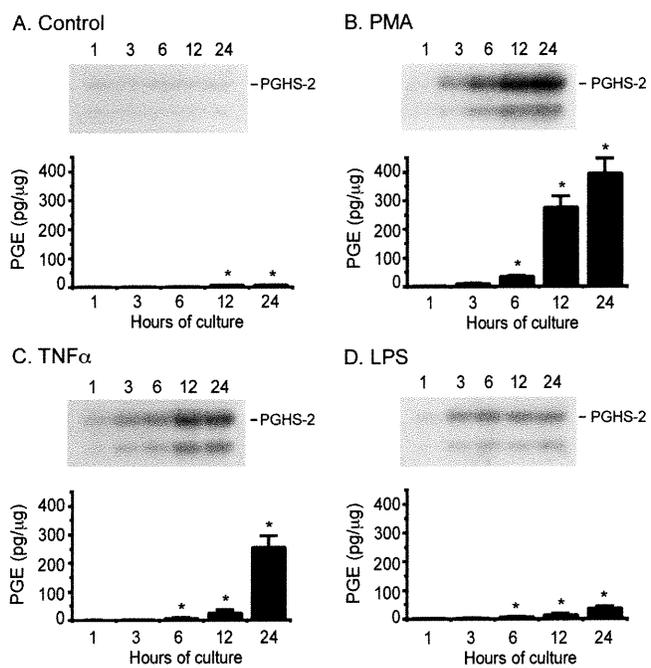


Fig. 3. Immunocytochemical detection of PGHS-2 in CPA cells. Immunocytochemistry was performed on CPA cells cultured for 24 h in the absence (A and B) or presence of PMA (10 ng/ml, C, D and E) and TNF- α (50 ng/ml, F), as described in *Materials and Methods*. Immunostaining with a PGHS-2 selective antibody (antibody 243) revealed that PGHS-2 immunoreactivity was present in control cells (A and B), and was markedly increased after PMA (C and D) and TNF- α (F) stimulation. Immunostaining with a PGHS-1 selective antibody indicated the presence of low or undetectable of PGHS-1 immunoreactivity in PMA-stimulated cultures (E). Control staining with normal rabbit serum or PBS was negative (data not shown). Results are representative of three independent experiments.

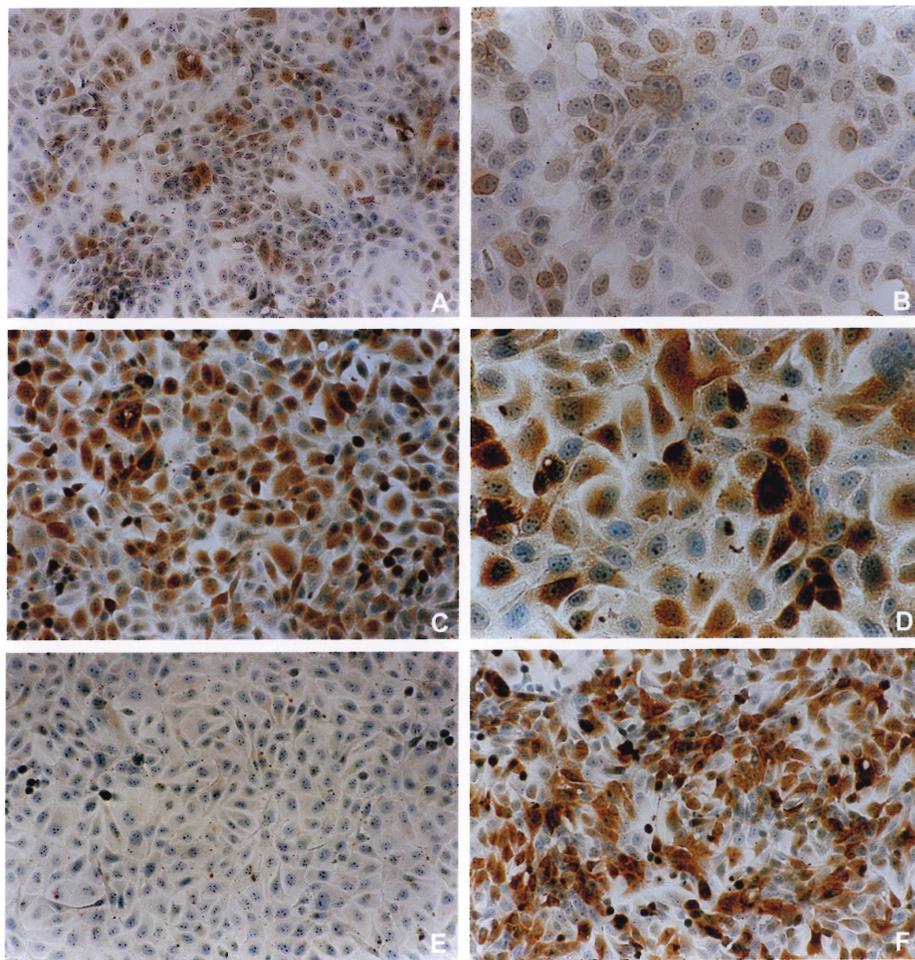


Fig. 4. Nucleotide sequence of the canine PGHS-2 cDNA. The complete nucleotide sequence was obtained by a combination of cDNA library screening and 5'-RACE, as described in *Materials and Methods*. The canine PGHS-2 cDNA is composed of a 5'-untranslated region of 28 bp (lowercase letters), an open reading frame of 1815 bp (uppercase letters) and a 3'-untranslated region of 1655 bp (lowercase letters). The translation initiation (ATG) and stop (TAG) codons are highlighted in *bold*; repeats of the Shaw-Kamen's sequence (ATTTA) in the 3'-untranslated region are *underlined*; and numbers appearing on the right refer to the last nucleotide on that line. The nucleotide sequence was submitted to GenBank (accession number AY044905).

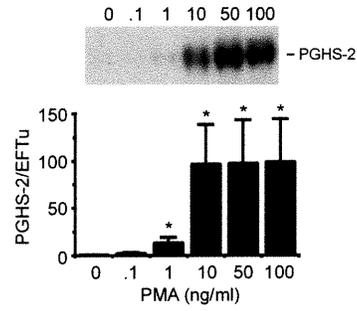
tggagcacgcctcggaactccgcc	gcg ATG CTGGCCCGCCCTGGTGC	TCTGCGCCGCCCTGGCGGTCGTCCG	CGCAGCAAATCCTTGCTGTTCCAC	100
CCATGTCAAAACCAAGGTTTGTGTA	TGAGCACAGGATTTGACAGTATAA	GTGTGACTGTACCCGAACAGGATTC	TACGGCGAAAACCTGCTCAACACCGG	200
AATTTCTGACAGAATAAAATATA	CCTGAAACCCACTCCAAATACAGTA	CACTACATACTTACCCACTTCAAGG	GAGTCTGGAACATGTCAATAACAT	300
CCCCCTCCTGCGAAATACAATTATG	AAATATGTGTTGACATCCCGGTAC	ATTTGATGAGAGTCCACCAACTTA	TAATGTGAACACGGCTATAAAAGC	400
TGGGAAGCCTTTTCTAACCTCTCCT	ATTATACCAGAGCTCTCCCCCTGT	ACCTGATGACTGTCCAACCCCATG	GGTGTGAAAGGCAAGAAGAGCTTC	500
CTGATTCAAAGAGATTGTGAAAA	GTTTCTTCTGCGAAGAAAGTTCATT	CCTGATCCCCAAGGCACCAATATGA	TGTTTGCATCTTTTGCCAGCACTT	600
TACCCATCAATTTTCAAGACAGAT	CATAAGCGAGGACCAGCTTTCACCA	AAGGATTTGGCCATGGGGTGGACTT	AAATCATGTTTATGGGGAAACTTTG	700
GATAGACAACATAAACTGCGCCTTT	TCAAGGATGGAAAAATGAAATATCA	GGTAATTGATGGAGAGGTGTATCCT	CCTACCGTCAAAGATACTCAGGTCG	800
AGATGATCTACCCACCTCATGTTC	TGAACACCTGCAGTTTGTCTGGGGC	CAGGAGGTCTTTGGTCTGGTGCCTG	GTCTGATGATGTATGCCACCATTG	900
GCTGCGGGAGCATAACAGAGTGTGT	GATGTGCTTAAACAGGAGACCCAG	AATGGGATGATGAGCGGTTATTCCA	GACGAGCAGGCTAATACTTATAGGA	1000
GAAACCATTAAAGATTGTGATTGAAG	ACTATGTACAACACTTGAGTGGCTA	TCACTTCAAGCTGAAGTTTGACCCA	GAGCTGCTTTTCAACCAACAATTC	1100
AGTACCAAACCGCATTGTCTGCTGA	GTTTAAACACACTTACCCTGGCAT	CCCCCTCTGCCTGACACCTTGCAAA	TAGATGACCAGGAGTACAATTTCCA	1200
ACAGTTTATCTACAACAACCTCTATA	TTATTGGAACATGGCCTTACCCAGT	TTGTGGAATCATTCAGCAGGCAAA	TGCTGGCAGGGTTGCCGGTGGCAGG	1300
AATGTTCCAGCTGCAGTACAACAAG	TAGCAAAAAGCTTCGATTGACCAGAG	CAGACAGATGAAATAACAGTCTCTT	AATGAGTATCGCAAACGCTTTAGCC	1400
TGCCCTCTTGGTAGAAAAGCCTCGT	ACTTACAGGAGAGAAGGAAATGGCT	GCGGGGTTGGAGGCCCTTTATGGTG	ATATTGATGCCATGGAGCTGTATCC	1500
ATCTGTTACCTGACTACTGGAAGC	CCAGATGCCATCTTTGGTGAGACCA	TGGTAGAAATGGGAGCACCATTTCTC	CTTGAAGGACTTATGGGTAATCCC	1600
TGAAGGGCTGTCCATTCACTGCATT	CTAGCACCTTTGGTGGAAGTAGG	CTTTAAATCATCAACACTGCCTCA	ATCCAGTCTCTCATCTGCAATAACG	1700
CAATCCACAGTCTACTGAAAGAA	CTCTGTTCAAGACGGACAACCTACC	AAAACAGTCACCATTAATGCAAGCT	CTTCGCACCTCCGGTCTAGATGACAT	1800
taataat	CGGTCAACTGAACTATAGaagcctg	ttaatcctatttatttatttatatg	gacgattccttttaacttaattatt	1900
taataat	ttacttaacatctgttaaggagaaa	ggggtcatacttgtgaagatthtca	tgctactatthtaagatgtctctg	2000
ggata	ttttataaatgagttgacatcctt	ttacttgaatthcagtttatattat	tattatgaacaaaagcgaagatgtt	2100
ggata	gacaaaatgctgcaagttttttctg	acactatcgggatttctagtgtatc	ttcctgggtgcattagaagcaacta	2200
cctg	agccactgtggctgtgaaaactctc	ttctgatcagtttactttcttggtt	tccttgattthtaagatctgagtat	2300
acct	tttcttacctgaactgtgtgaagtt	ttcaggaaaacctcaactcaggact	actagtaatthtagctcctcttaaga	2400
ggaat	ccttaaggactctatacacaacag	tatacacttattthtaagtgaaggg	agcgatctthttgtaaatthatttt	2500
aaatt	ggctaagtactgacaaagaactgta	gggggttcttgatggaaggaagtcg	tatttctattaagaatatcctttct	2600
ca	aatagttcccggaagataatgttt	ctttccacatctcatgtcagctg	acatttgctggtagctgtatactthaa	2700
tt	ggttaggatgttattataaactagg	tttaagctgcaatctthttttttt	tgcatatgtgagaatcagtatatc	2800
tt	tatgtaaacactaagagaattatt	tgagatctgtgagtaaatthtcagg	aaccaactctggatatattgaaata	2900
tg	ttccctatataccagcccacagag	aacactgtgtctcattaacctgcat	gtaccataagatctthtacagttttg	3000
ag	tcattcagctataaactatttgagga	cacaggtgcaaatatcactgtgggt	tttaaatthttttggtgattctaat	3100
tt	gataacatcagtatthtgaatgag	aaagcatgtctthtaggtagagaaag	aaaatgaaatthttatthaaagaaat	3200
aact	atgthtaaaaagtttaagaaatgct	aatattagaagggcttatgtaaaaa	cctthtttaactcactgaaagaaat	3300
tt	gattoggagtataatataatgaatg	tttgggtgcctcagacaaatgtgta	tttaaatthacttatgtgaagatgta	3400
ag	ttactatctaaagatgaaaaatc	tcttctaaaataaathtttgactgt	ttccataaaaaataaaaaaaa	3498

Fig. 5. Predicted amino acid sequence of canine PGHS-2 and comparison with the human homolog. Identical residues are indicated by a printed period. The signal peptide cleavage site is indicated with an inverse triangle and the putative transmembrane region is double underlined. The tyrosine (Tyr-371) associated with the cyclooxygenase active site is underlined, heme-coordination residues (His-295 and His-374) are overlined, and the aspirin-acetylated serine residue (Ser-516) is indicated by a number sign. Potential N-glycosylation sites are marked with an asterisk.

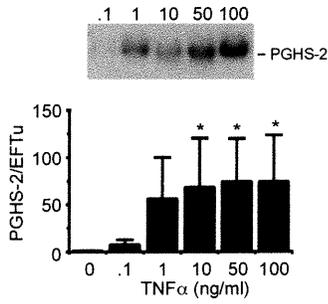
can	MLARALVLCALAVVRAANPCCSHPCQNQGICMSTGFDQYKCDCTRGFY	50
humL...V..LSHT.....R.V...V.....K.....	50
can	* GENCSTPEFLTRIKLYLKPTPNTVHYILTHFKGVVNIIVNNIPFLRNTIMK	100
humF.....F..V.....A..S	100
can	* YVLTSRSHLIESPPTYNVNNGYKSWEAFSNLSYYTRALPPVPDDCPTPMG	150
humD.....AD.....L.	150
can	VKGKKELPDSKEIVEKFLRRKFIIPDPQGTNMMFAFFAQHFTHQFFKTDH	200
humQ....N...G.....S.....	200
can	KRGPAFTKGLGHGVDLNHVYGETLDRQHKLRLFKDGKMKYQVIDGEVYPP	250
humN.....I.....A..R.....I...M...	250
can	TVKDTQVEMIYPHVPEHLQFAVGQEVFGLVPLMMYATIWLREHNRVCD	300
humA.....Q.....R.....	300
can	VLKQEHPEWDDERLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKDPE	350
humG..Q.....	350
can	* LLFNQFQYQNRIAAEFNTLYHWHPLLPDTLQIDDQEYNFQFIIYNSIL	400
hum	...K.....F..H..K..Y.....	400
can	LEHGLTQFVESFSRQIAGRVAGGRNVPAAVQVAKASIDQSRQMKYQSLN	450
hum	...I.....T.....P..K.SQ.....F.	450
can	EYRKRFRPKPYTSFEELTGEKEMAAGLEALYGDIDAMELYPALLVEKPRP	500
humM...E.....S.E.....V.....	500
can	# DAIFGETMVEMGAPFSLKGLMGNPICSPDYWKPSTFGGEVGFKIINTASI	550
humV.....V...A.....Q.....	550
can	* QSLICNNVKGCPFTAFSVQDGLTKVTINASSSHSGLDDINPTVLLKER	600
humS...P.PE.I.....R.....	600
can	STEL 604	
hum 604	

Fig. 6. Dose-dependent induction of PGHS-2 mRNA by PMA, TNF- α and LPS in CPA cells. CPA cells were cultured for 6 h in the absence of agonist (0 ng/ml; A) or presence of graded doses of PMA (A), TNF- α (B) and LPS (C), and samples of total RNA (10 μ g/lane) were analyzed by Northern blotting using a 32 P-labeled canine PGHS-2 cDNA probe, as described in *Materials and Methods*. Results from a representative experiment (*autoradiograms*) are shown; the control culture (0 ng/ml) shown in *panel A* is also the no treatment control for *panels B and C*. Markers on the right indicate migration of intact PGHS-2 mRNA (4.0 kb). The same blots were stripped of radioactivity and hybridized with a cDNA encoding the rat elongation factor Tu (EFTu) as a control gene for RNA loading (data not shown). For semi-quantitative analyses, the PGHS-2 signal intensity was quantified by densitometric analysis, and normalized with the control gene EFTu. Results are presented as PGHS-2 mRNA levels relative to EFTu (mean \pm SEM of three independent experiments). Columns marked with an asterisk are significantly different from controls (0 ng/ml; $P < 0.05$).

A. PMA



B. TNF α



C. LPS

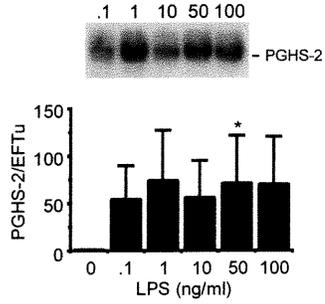
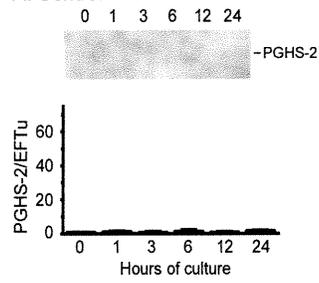
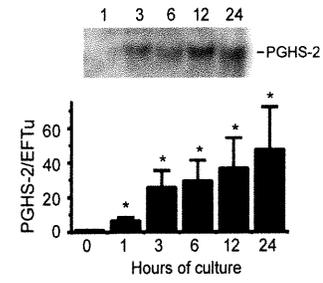


Fig. 7. Time-dependent induction of PGHS-2 mRNA by PMA, TNF- α and LPS in CPA cells. CPA cells were cultured for 1-24 h in presence or absence of PMA (10 ng/ml), TNF- α (50 ng/ml) and LPS (10 ng/ml), and samples of total RNA (10 μ g/lane) were analyzed by Northern blotting using a 32 P-labeled canine PGHS-2 cDNA probe, as described in *Materials and Method*. A representative blot is shown for each agonist; markers on the right indicate migration of intact PGHS-2 mRNA (4.0 kb). The same blots were stripped of radioactivity and hybridized with a cDNA encoding the rat elongation factor Tu (EFTu) as a control gene for RNA loading (data not shown). For semi-quantitative analyses, the PGHS-2 signal intensity was quantified by densitometric analysis, and normalized with the control gene EFTu. Results are presented as PGHS-2 mRNA levels relative to EFTu (mean \pm SEM of three independent experiments). Columns marked with an asterisk are significantly different from the 0 h time point ($P < 0.05$).

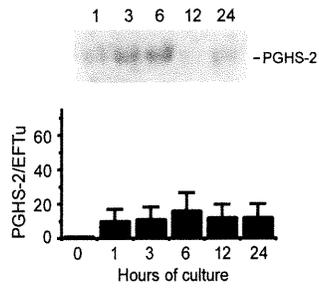
A. Control



B. PMA



C. TNF α



D. LPS

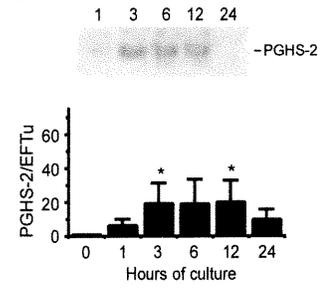
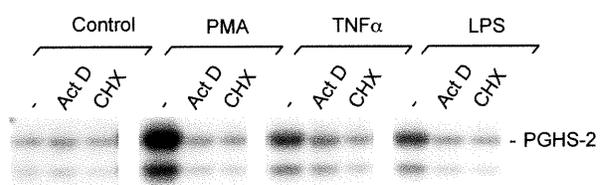
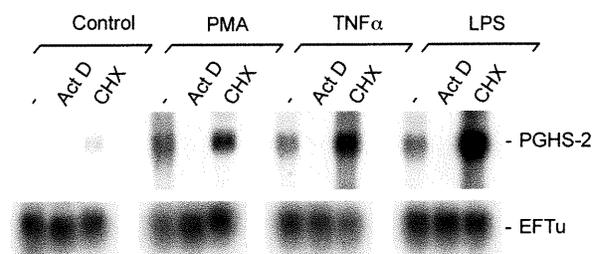


Fig. 8. Effect of transcriptional and translational inhibitors on agonist-dependent induction of PGHS-2 in CPA cells. CPA cells were cultured in absence or presence of PMA (10 ng/ml), TNF- α (50 ng/ml) and LPS (10 ng/ml) with or without actinomycin D (5 μ g/ml) or cycloheximide (10 μ g/ml), as described in *Materials and Methods*. A, cell extracts were prepared after 6 h of agonist stimulation, and proteins (50 μ g/lane) were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and immunoblotting techniques using a PGHS-2 selective antibody. B, total RNA was extracted from cells after 3 h of agonist stimulation and samples (10 μ g/lane) were analyzed by Northern blotting using a 32 P-labeled canine PGHS-2 cDNA probe. The same blots were stripped of radioactivity and hybridized with a cDNA encoding the rat elongation factor Tu (EFTu) as a control gene for RNA loading. Representative immunoblots (A) and Northern blots (B) from one experiment are shown; similar results were obtained from two other independent experiments. Markers on the right indicate migration of intact PGHS-2 protein ($M_r = 72,000$) and mRNA (4.0 kb), and EFTu mRNA (1.8 kb).

A. Immunoblot



B. Northern blot



5. Discussion

Actuellement, il est admis que l'adénocarcinome prostatique spontané canin est un modèle approprié pour les études du cancer de la prostate chez l'homme (Waters et coll., 1998). Les cultures primaires des cellules épithéliales prostatiques canines constituent aussi un bon modèle (Terracio et coll., 1982). La lignée CPA 1 que nous avons utilisée dans cette étude a été établie à partir d'un adénocarcinome prostatique primaire canin par Eaton et coll. (1988). Cette lignée est considérée comme étant modérément différenciée en se basant sur son apparence histologique, ayant un arrangement bien défini des acini. Elle est dépourvue des récepteurs pour les androgènes et les oestrogènes et sa croissance *in vitro* est indépendante de ces hormones.

Un objectif spécifique de la présente étude était d'étudier le contrôle de l'expression de la PGHS-2 dans la lignée CPA 1. Pour cela, ces cellules ont été cultivées en absence ou en présence de trois agents: le PMA qui est un promoteur de tumeur, le TNF- α qui est une cytokine pro-inflammatoire et le LPS qui est une endotoxine bactérienne et un agent pro-inflammatoire. Ces trois agents sont des inducteurs puissants de l'expression de la PGHS-2 dans d'autres systèmes cellulaires (Yamamoto et coll., 1997; Liu et coll., 2001; Wadleigh et coll., 2000). Nos résultats ont démontré que la PGHS-2 est exprimée à des concentrations faibles et la PGE₂ est synthétisée à des concentrations détectables dans les cellules contrôles. Ces concentrations sont augmentées de façon dose-dépendante et temps-dépendante dans les cellules

stimulées par les agents utilisés, les concentrations de la PGE₂ augmentant de façon parallèle à ceux de la protéine. Ces résultats ont été confirmés par immunocytochimie dans les cellules cultivées en absence ou en présence du PMA et du TNF- α .

Un autre objectif spécifique de la présente étude était la caractérisation de la PGHS-2 canine. Le clonage et le séquençage de l'ADNc ont révélé que sa structure, qui comporte un cadre de lecture ouvert de 1815 pb et une grande région 3' non traduite contenant 10 répétitions du motif ATTTA de Shaw-Kamen, est similaire à celle de ses orthologues clonés chez les mammifères. La séquence en acides aminés de la protéine, déduite de la région codante de l'ADNc, est également conservée par rapport aux domaines structuraux et aux acides aminés importants. L'identité de séquence avec la protéine humaine dépasse 88%.

L'ADNc cloné a été ensuite utilisé pour étudier le contrôle de l'ARNm de la PGHS-2 dans les cellules CPA 1. Nos résultats des inductions par le PMA, le TNF- α et le LPS ont montré que l'ARNm de la PGHS-2 était indétectable dans les cellules contrôles mais que ses concentrations étaient augmentées progressivement de façon dose-dépendante et temps-dépendante dans les cellules stimulées. Ces résultats suggèrent que les concentrations importantes de la protéine observées dans les cellules stimulées sont liées à l'induction du transcrit. Nos résultats, montrant l'expression de la PGHS-2 (ARNm, protéine et activité) dans les cellules CPA 1 non stimulées, sont en accord avec ce qui est rapporté par de nombreux travaux indiquant que cette enzyme est présente dans

les cancers humains (Denkert et coll., 2001; Tucker et coll., 2001), dans les cancers animaux (Pestili De Almeida et coll., 2001), dans les lignées épithéliales cancéreuses (Denkert et coll., 2001) et dans les lignées transformées par les virus et les oncogènes (Xie et coll., 1995; Subbaramaiah et coll., 1996). La PGHS-2 est également présente dans le cancer de la prostate *in vivo* chez l'homme (Gupta et coll., 2000; Uotila et coll., 2001) et chez le chien (Tremblay et coll., 1999) et *in vitro* dans les lignées épithéliales prostatiques cancéreuses humaines (Hsu et coll., 2000; Subbarayan et col., 2001).

Les faibles concentrations de la PGHS-2 (ARNm, protéine et activité) dans les cellules CPA 1 non stimulées sont comparables à ceux rapportés par Subbarayan et coll. (2001) mais différent de ceux rapportés par Gupta et coll. (2000), Uotila et coll.(2001), Yoshimura et coll.(2000) qui trouvent des concentrations élevées de l'ARNm et de la protéine PGHS-2 dans le tissu prostatique cancéreux humain. Dans d'autres types de cancers, l'expression de la PGHS-2 (ARNm, protéine et PGE₂) est généralement élevée (Fosslie, 2000). Les faibles concentrations de la PGHS-2 détectées dans les cellules CPA 1 pourraient être liées à l'état modérément différencié de ces cellules. En effet, l'expression de la PGHS-2 dans le cancer de la prostate corrèlerait de façon négative avec le grade tumoral (Madaan et coll., 2000). L'augmentation des concentrations du transcrite de la PGHS-2 dans les cellules stimulées par les agents utilisés pourrait être dûe soit à une induction du gène soit à une stabilisation de l'ARNm. Nos résultats d'inductions en présence de l'actinomycine D et de la cycloheximide ont montré que l'induction du transcrite requiert une

activité transcriptionnelle et ne dépend pas d'une nouvelle synthèse des protéines. L'ARNm est même surinduit par la cycloheximide. Cette surinduction, observée aussi dans les cellules contrôles, est en accord avec le fait que le gène PGHS-2 est un gène immédiat précoce et pourrait être due à l'inhibition de la synthèse d'une ribonucléase qui dégraderait normalement le transcrit (Tjandrawinata et coll., 1997). Nos résultats, montrant un contrôle transcriptionnel de l'expression de la PGHS-2 dans les cellules CPA 1, sont en accord avec des études récentes indiquant que l'expression de cette enzyme dans les cancers (Kim et coll., 1998; Kojima et coll., 2000) et dans les lignées transformées par les oncogènes (Xie et coll., 1995; Subbaramaiah et coll., 1996) est contrôlée de façon positive au niveau transcriptionnel. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce contrôle dans le cancer de la prostate n'ont pas été rapportés mais dans les autres types de cancers, ils semblent être similaires à ceux ayant lieu dans les cellules normales. Ainsi, dans les cellules normales et cancéreuses, les sites NF- κ B (facteur nucléaire pour κ B), NF-IL6 (facteur nucléaire pour IL-6), CRE (élément de réponse pour l'AMPc) et la boîte E (élément de réponse pour c-Myc) localisés dans le promoteur proximal du gène PGHS-2 (Figure 6B) sont les sites requis pour l'induction de la PGHS-2 par différents stimuli. Les facteurs de transcription liant ces sites sont les protéines C/EBPs (protéines liant les sites CCAAT), NF- κ B, et c-Jun. Les voies de signalisation activées sont celles des MAPKs : ERKs (kinases régulées par les signaux extracellulaires), JNK (kinase terminale de c-Jun) et p38 MAPK, la voie de NF- κ B et la voie PI3K/Akt (tableau 1).

Tableau 1 : Voies de signalisation, facteurs de transcription et éléments de réponse impliqués dans l'induction de la PGHS-2

Type cellulaire	Phénotype Cellulaire	Agent Stimulant	Voie de Signalisation	Facteurs de Transcription	Elément de Réponse	références
NIH3T3	transformé	v-src	Ras/MEKK-1/JNK	c-jun	CRE	Xie et coll., 1995 ; 1996
Granulosa bovine	Normal	PDGF/serum	Ras/Raf-1/ERK			
Ostéoblastes murins MC3T3-E1	normal	Forskolin hCG		USF1 USF2	CRE NF-IL6 AP-2 Boîte E	Liu et coll., 2001
RIE (cellules intestinales de rat)	normal	TNF- α		NF- κ B C/EBP	NF- κ B NF-IL6	Yamamoto, 1997
RIE(IEC-1)	transformé	bombésine	ERK1/2 P38MAPK	ELK1, ATF2 AP-1	AP-1, SRE	Guo et coll., 2001
Monocytes humains	normal	K-Ras	JNK, ERK, PI3K/Akt	C/EBP, c-jun	CRE, NF-IL6, ARE	Sheng et coll., 2001
Macrophages murins (Raw264.7)	normal	LPS	P38MAPK		ARE	Dean et coll., 1999
CE-1 lignée	normal	LPS	JNK	c-jun, C/EBP	CRE, NF-IL6	Wadleigh et coll., 2000
AGS lignée	cancéreux (colon humain)	LPS	NF- κ B	NF- κ B	NF- κ B	Kojima et coll., 2000
JWF2 lignée	cancéreux (estomac humain)	Non stimulées	NF- κ B	NF- κ B	NF- κ B	Lim et coll., 2001
184B5/HER (épithel mammaire)	cancéreux (peau de souris)	Non stimulées		USF, C/EBP	NF-IL6, boîte E	Kim et coll., 1998
	normal	céramide	PKC, JNK, P38MAPK	c-jun	CRE	Subbaramaiah et coll., 1998

Nos résultats suggèrent que l'expression de la PGHS-2 dans les cellules CPA 1 non stimulées et probablement dans les cellules prostatiques cancéreuses humaines pourrait être due à une stimulation transcriptionnelle permanente du gène. Cette expression permanente de la PGHS-2 pourrait être due à des changements dans les composantes des voies de signalisation dont la nature précise n'a pas été identifiée. Cependant, des altérations moléculaires majeures ont été rapportées dans le cancer de la prostate qui ont été impliquées dans l'initiation et la progression de ce cancer et qui pourraient l'être *via* l'induction de la PGHS-2. Ces altérations incluent principalement l'activation d'oncogènes tels Ras et erbB2, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels p53 et PTEN, la dérégulation autocrine des facteurs de croissance, la dérégulation du métabolisme de l'acide arachidonique et la différenciation neuroendocrine. En effet, l'induction de la PGHS-2 dans les cellules normales *in vitro* a lieu suite à la stimulation par de nombreux agents incluant notamment les oncogènes, les facteurs de croissance, les neuropeptides et les prostaglandines qui agissent *via* les cascades des MAPKs. Les facteurs de croissance agissent principalement *via* les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), les neuropeptides et les prostaglandines agissent *via* les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Il est bien établi que la surexpression ou l'activation inappropriée des RTK, l'activation inappropriée des RCPG et/ou la surexpression des ligands de ces récepteurs fonctionnent comme des mécanismes oncogéniques *via* l'activation de la voie Ras/Raf/ERK (Amundadottir et coll., 1998). Cette voie joue un rôle majeur dans l'oncogénèse car elle transduit les

signaux de prolifération et de survie cellulaire (Porter et coll., 1998). Son activation est observée dans la plupart des cancers humains (Sheng et coll., 2000;2001) incluant celui de la prostate (Putz et coll., 1999). Dans les cancers humains, les RTK sont généralement soit activés de façon constitutive par des mutations ponctuelles, soit surexprimés. Le RTK le plus fréquemment surexprimé est EGFR et sa surexpression favorise la création d'une boucle autocrine de sorte que le potentiel mitogénique de l'EGF est sélectivement augmenté (Porter et coll., 1998). Les RTK, *via* la voie Ras/ ERK peuvent également promouvoir la surexpression d'un facteur de croissance tel IGF-1 qui est un facteur de survie *via* la voie anti-apoptotique PI3K/Akt (Porter et coll., 1998). Dans le cancer avancé de la prostate, les facteurs de croissance EGF, $TGF\alpha$, IGFs, $TGF\beta$ et FGFs et leurs récepteurs sont tous surexprimés, tous fonctionnent *via* des boucles autocrines (Russell et coll., 1998 ; Jenster, 1999 ; Daliani et coll., 1999), tous sont mitogéniques pour les cellules cancéreuses de la prostate (Jones et coll., 1997; Putz et coll., 1999) et tous induisent fortement l'expression de la PGHS-2 dans différents types cellulaires (Fosslie, 2000). De plus, une activité tyrosine kinase élevée, corrélée à une expression élevée des protéines tyrosine kinases (PTK) non récepteurs Src, Fer, FAK, Lyn et Fyn a été rapportée dans le cancer prostatique humain, dans les lignées cellulaires prostatiques cancéreuses humaines et dans les cellules épithéliales basales prostatiques canines stimulées par les oestrogènes *in vivo* (Allard et coll., 1997; 2000 ; Tremblay et coll., 1996). L'expression de la PGHS-2 observée dans les cellules CPA 1 et dans le cancer de la prostate pourrait donc être secondaire à la

surexpression des facteurs de croissance et de leurs récepteurs qui, *via* des boucles autocrines et *via* la voie des ERKs envoient un signal stimulateur permanent (Porter et coll., 1998). Le rôle des RTK et des facteurs de croissance dans la progression du cancer de la prostate et dans sa transition vers l'androgéno-indépendance est bien établi (Daliani et coll., 1999; Jenster, 1999) et il pourrait l'être *via* l'induction de la PGHS-2. De plus, tous les facteurs mitogènes qui stimulent la prolifération cellulaire *via* la voie des ERKs, stimulent également la survie cellulaire *via* la voie anti-apoptotique PI3K/Akt (Amundadottir et coll., 1998). En outre, NF- κ B qui est un puissant stimulateur de l'expression de la PGHS-2, agirait en aval de cette voie (Ozes et coll., 2000).

L'expression permanente de la PGHS-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques pourrait aussi être secondaire à l'activation d'oncogènes tel erbB2, un RTK fréquemment activé dans le cancer de la prostate (Bostwick, 1994). erbB2 stimule fortement l'expression de la PGHS-2 (Vadlamudi et coll., 1999) et active les voies des ERKs et de la JNK (Amundadottir et coll., 1998; Hung et coll., 1999). De son côté, Ras activé stimule l'expression de la PGHS-2 dans différents types cellulaires *via* les voies de la JNK, ERK et PI3K/Akt (Sheng et coll., 2000; 2001; Subbaramaiah et coll., 1996). L'expression de la PGHS-2 dans les cellules cancéreuses de la prostate pourrait aussi être une conséquence de la dérégulation du métabolisme de l'acide arachidonique (Marks et coll., 2000) et de la différenciation neuroendocrine, responsables respectivement des concentrations élevées de prostaglandines et de neuropeptides observées dans ce cancer. En effet, les prostaglandines telle la PGE₂ (Tjandrawinata et coll.,

1998) et les neuropeptides telle la bombésine (Guo et coll., 2001) contrôlent de façon positive l'expression de la PGHS-2. Ces molécules agissent en activant de façon autocrine et paracrine des récepteurs RCPGs spécifiques et en stimulant la voie Ras/Raf/ERK. Les prostaglandines agissent *via* la voie Gq11/PLC/PKC et l'activation directe de Raf-1 par PKC (Gutkind, 1998; Marks et coll., 2000). Les neuropeptides agissent *via* une élévation de l'AMPc et l'activation de PKA dans une voie impliquant Rap-1 et B-Raf (Chen et coll., 1999). Prostaglandines et neuropeptides sont impliquées dans la progression du cancer de la prostate et dans la croissance androgéno-indépendante des cellules tumorales dans le cancer avancé (Allard et coll., 2000; Daliani et coll., 1999; Marks et coll., 2000). L'expression de la PGHS-2 pourrait être secondaire à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels les gènes p53 et PTEN qui sont fréquemment mutés ou perdus dans le cancer de la prostate (Ruijter et coll., 1999). En effet, la protéine p53 sauvage contrôle négativement l'expression de la PGHS-2 (Subbaramaiah et coll., 1999). De son côté, l'inactivation de PTEN pourrait aussi contribuer à l'expression de la PGHS-2 *via* la voie PI3K/Akt.

Le modèle proposé pour l'induction de la PGHS-2 et l'élévation des concentrations de la PGE₂ dans le cancer de la prostate, emprunté à celui du carcinome cutané de la souris (Marks et coll., 2000) (Figure 11) est qu'au cours du développement tumoral, la voie Ras/Raf/ERK devient activée de façon permanente suite à une activation des oncogènes Ras ou erbB2 ou suite à la dérégulation autocrine des facteurs de croissance ou du métabolisme de l'acide arachidonique. *Via* cette voie, les facteurs de croissance et la PGHS-2 sont co-

induits, notamment par les prostaglandines qui, *via* la voie Gq 11/ ERK, jouent un rôle autoamplificateur de leur propre synthèse et induisent celle de nombreux gènes qui médient leurs effets promoteurs de tumeurs. De plus, tous les agents qui activent la voie Ras/Raf/ERK activent également la cPLA₂ et stimulent la libération de l'acide arachidonique. Les autres voies : JNK, p38, PI3K et NF-κB, sont également activées par les stimuli qui activent la voie Ras/ERK et synergisent avec cette voie dans l'expression de la PGHS-2 et la promotion de la carcinogénèse prostatique. Ainsi, la surexpression de la PGHS-2 et la libération concomitante de l'acide arachidonique contribuent aux concentrations élevées de la PGE₂ observées dans le cancer de la prostate. Ces données suggèrent par conséquent que la voie Ras/Raf/ERK pourrait être une cible potentielle dans la stratégie chimiopréventive du cancer de la prostate. Les AINS sélectifs exercent des effets anti-prolifératifs, anti-angiogéniques et pro-apoptotiques (Myers et coll., 2001; Liu et coll., 2000). Combinés à un agent inducteur de la différenciation tel l'acide rétinoïque et à des inhibiteurs de la voie des ERKs tels le resvératrol, le curcumin ou la staurosporine, les AINS pourraient être des agents chimiopréventifs très efficaces (Subbaramaiah et coll., 1997; Hong et coll., 1997). D'un point de vue fondamental, les voies qui mènent à l'expression de la PGHS-2 sont les voies qui mènent à l'inflammation et aussi à la carcinogénèse. Comme l'inflammation chronique est un facteur de risque du cancer, la PGHS-2 constituerait le lien entre ces deux processus (Prescott et coll., 2000), ce qui explique les effets anti-tumoraux des AINS et leur intérêt comme agents chimiopréventifs. Des données récentes impliquent également la

PGE synthétase (PGES) dans la carcinogénèse (Jacobson et coll., 1999). Comme l'expression de la PGHS-2 et de la PGES sont coréglées pour la synthèse de la PGE₂ (Jacobson et coll., 1999), il serait intéressant d'examiner le rôle de la PGES et son interaction avec la PGHS-2 dans la carcinogénèse prostatique pour un contrôle plus efficace du cancer de la prostate.

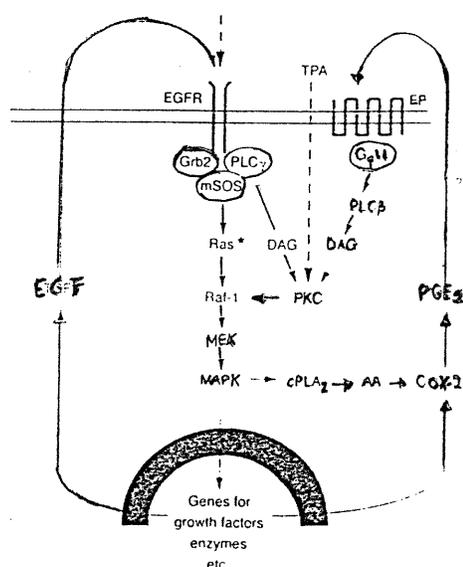


Figure 11. Mécanismes impliqués dans l'induction de la PGHS-2. La PGHS-2 est induite suite à la mutation d'un oncogène tel Ras (Ras*). Via la voie Ras/ERK, les facteurs de croissance tel EGF/TGF α et la PGHS-2 sont co-induits alors que la cPLA₂ est activée. La PGE₂ et les facteurs de croissance, par des boucles autocrines, maintiennent cette voie activée en permanence.

6. Conclusions

Les conclusions de cette étude sont :

1. La région codante de la PGHS-2 canine encode une protéine de 604 acides aminés qui est fortement conservée (identité avec la PGHS-2 humaine supérieure à 80%).
2. La PGHS-2 (ARNm, protéine et activité) est exprimée à de faibles concentrations dans les cellules épithéliales cancéreuses de la prostate du chien.
3. Le PMA, le TNF- α et le LPS causent une augmentation de l' expression de l'ARNm, de la protéine et de la synthèse de la PGE₂ de façon dose-dépendante et temps-dépendante. Le PMA est un puissant inducteur alors que le LPS est un faible inducteur de l' expression de la PGHS-2 dans ces cellules cancéreuses.
4. L'induction de l' ARNm de la PGHS-2 n'est pas dépendante de la synthèse des protéines mais requiert une activité transcriptionnelle.

7. Bibliographie

Allard P, Atfi A, Landry F, Chapdelaine A, Chevalier S (1997) Estradiol activates p60^{src}, p53/56^{lyn} and renatured p50/55 protein tyrosine kinases in the dog prostate. *Mol Cell Endocrinol* 126 : 25-34.

Allard P, Beaulieu P, Aprikian A, Chevalier S (2000) Bombesin Modulates the Association of Src with a Nuclear 110-kd Protein Expressed in Dividing Prostate cells. *J Androl* 21:367-375

Allard P, Zoubeydi A, Nguyen LT, Tessier S, Tanguay S, Chevrette M, Aprikian Armen, Chevalier S (2000) Links between Fer tyrosine kinase expression levels and prostate cell proliferation. *Mol Cell Endocrinol* 159:63-77

Amundadottir LT, Leder P (1998) Signal transduction pathways activated and required for mammary carcinogenesis in response to specific oncogenes. *Oncogene* 16:737-746

Anidjar M, Villette JM, Devauchelle P, Delisle F, Cotard JP, Billotey C, Cochard-Priollet B, Copin H, Barnoux M, Triballeau S, Rain JD, Fiet J, Teillac P, Berthon P, Cussenot O (2001) *In vivo* mimicking natural history of dog prostate cancer using DPC-1, a new canine prostate. *Carcinoma Cell. The Prostate* 46(1): 2-10

Antaya M (1997) Clonage et caractérisation du gène et du promoteur de la prostaglandine G/H synthétase de type 2 chez le bovin. Mémoire de Maitrise FES. Université de Montréal

Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T (1994) Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem J* 302:723-727

Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno (2000) Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 60(16): 4629-37

Aumüller G (1983) Morphologic and endocrine aspects of prostatic function. *The prostate* 4:195-214

Badawi AF (2000) The role of prostaglandin synthesis in prostate cancer. *BJU Int* 85(4):451-462

Balsinde J, Balboa Ma, Insel PA, Dennis EA (1999) Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:175-89

Barsanti JA, Finco DR (1986) Canine prostatic diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 16(3):587-99

Bell FW, Klausner JS, Hayden DW, Feeney DA, Johnston SD (1991) Clinical and pathologic features of prostatic adenocarcinoma in sexually intact and castrated dogs: 31 cases (1970-1987). *J Am Vet Med Assoc* 199(11):1623-30

Bell FW, Klausner JS, Hayden DW, Lund EM, Liebenstein BB, Feeney DA, Johnston SD, Shivers JL, Ewing CM, Isaacs WB (1995) Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. *J Vet Intern Med* 9(3):149-53

Berry S, et coll. (1986) Effects of aging on prostate growth in beagles. *Am J Physiol* 250:R1039

Boerboom D, Sirois J (1998) Molecular characterization of equine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation of its messenger ribonucleic acid in preovulatory follicles. *Endocrinology* 139:1662-1670

Bostwick DG (1994) c-erbB-2 Oncogène Expression in Prostatic Intraepithelial Neoplasia: Mounting Evidence for a Precursor Role. *J Natl Cancer Inst* 86(15):108-111

Bostwick DG (1996) Prospective Origins of Prostate Carcinoma. *Cancer* 78:330-336

Bruckheimer EM, Gjertsen BT, McDonnell TJ (1999) Implications of cell death regulation in the pathogenesis and treatment of prostate cancer. *Semin Oncol* 26(4):382-398

Capdevilla JH, Falck JR, Estabrook RW (1992) Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB J* 6:731-736

Chan ECY, Sulmasy DP (1998) What Should Men Know about Prostate-Specific Antigen Screening before Giving Informed Consent?. *Am J Med* 105:266-274

Chaudry AA, Wahle KWJ, McClinton S, Moffat LEF (1994) Arachidonic acid metabolism in benign and malignant prostatic tissue in vitro: effects of fatty acids and cyclooxygenase inhibitors. *Int J Cancer* 57:176-80

Chen T, Cho RW, Stork PJS, Weber MJ (1999) Elevation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate potentiates activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 59: 213-218

Chevalier S, Bleau G, Robert KD, Chapdelaine A (1980) Characterization of Canine Prostatic Cells From Normal And Hyperplastic Glands. *Mol Cell Endocrinol* 20:59-70

Chevalier S, Bleau G, Robert KD, Chapdelaine A (1981) Proliferation And Differentiation of Canine Prostatic Epithelial Cells In Culture. *Mol Cell Endocrinol* 24:195-208

Crofford LJ (1997) COX-1 and COX-2 tissue expression : implications and predictions. *J Rheumatol* 24(49):15-9

Daliani D, Papandreou CN (1999) Markers of androgen-independent progression of prostatic carcinoma. *Semin Oncol* 26(4):399-406

Dannenber AJ, Zakim D (1999) Chemoprevention of colorectal cancer through inhibition of cyclooxygenase-2. *Semin Oncol* 26(5):499-504

Dean JLE, Brook M, Clark AR, Saklatvala J (1999) p38 mitogen-activated protein Kinase Regulates Cyclooxygenase-2 mRNA Stability and Transcription in lipopolysaccharide-treated human Monocytes. *J Biol Chem* 274:264-269

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

Dennis EA (2000) Phospholipase A2 in Eicosanoid. *Am J Respir Crit Care Med* 161(2):S32-S35

Dennis LK (2000) Analysis of recent trends in prostate cancer incidence and mortality. *The Prostate* 42(4):247-52

Dewitt DL, Smith WL (1988) Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:1212-1416

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

DeWitt DL (1999) Cox-2-Selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol* 55(4):625-631

Dinchuk JE, Car BD, Focht KJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM et al. (1995) Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378:406-409

Dionne FT, Chevalier S, Bleau G, Robert KD, Chapelaine A (1983) Induction of acid phosphatase synthesis in canine prostatic epithelial cells in vitro. *Mol. Cell Endocrinol* 33: 113-126

Di Sant'Agnese PA, Cockett AT (1996) Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer* 78(2) : 357-61

Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2000)
Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. *J Biol Chem*
275(16):11750-11757

**Dubois RN ,Abramson S.B ,Crofford L , Gupta R.A , Simon L.S , Van De
Putte LBA , Lipsky PE** (1998) Cyclooxygenase in Biology and disease. *FASEB
J* 12:1063-1073

Durham SK, Dietze AE (1986) Prostatic adenocarcinoma with and without
metastasis to bone in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 188(12):1432-6

Eaton CL, Pierrepoint CG (1988) Growth of a Spontaneous Canine Prostatic
Adenocarcinoma In Vivo and In Vitro: Isolation and Characterisation of a
Neoplastic Prostatic Epithelial cell Line, CPA 1. *The Prostate* 12:129-143

**Eberhart CE, Coffey RJ, Radhi ka A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois
RN** (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human
colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107: 1183-1188

Faas FH, Dang AQ, Pollard M, Hong XM, Fan K, Luckert PH, Schutz M (1996)
Increased phospholipid fatty acid remodeling in human and rat prostatic
adenocarcinoma tissues. *J Urol* 156:243-248

Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E, Wilson CB, Hwang G (1993) Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys* 307:361-368

Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR (1992) Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem* 267(7):4338-4344

Fosslien E (2000) Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 30(1):3-21

Fosslien E (2000) Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 37(5):431-502

Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA (1991) Human platelet / erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J* 5:2304-2312

Garravito RM, DeWitt DL (1999) The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 1441 (2-3):278-87

Gately S (2000) The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 19:19-27

Gilroy DW, Colville-Nash PR (2000) New insights into the role of COX-2 in inflammation. *J Mol Med* 78(3):121-129

Gleason DF (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemotherapy Reports* 50(3):12

Griffiths G, Jones HE, Eaton CL, Stobart AK (1997) Effect of n-6 polyunsaturated fatty acids on growth and lipid composition of neoplastic and non-neoplastic canine prostate epithelial cell cultures. *The Prostate* 31:29-36

Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H (2000) Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *The Prostate* 42:73-78

Guo YS et coll. (2001) AP-1 Transcription Factor Mediates Bombesin-Stimulated COX-2 Expression in Intestinal Cells. *J Biol Chem* 276 :22941

Gutkind JS (1998) Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 17: 1331-1342

Han J, Sadowski H, Young DA, Macara IG (1990) Persistent induction of cyclooxygenase in p60^{v-src}-transformed 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3373-3377

Hansen WR, Keelan JA, Skinner SJM, Mitchell MD (1999) Key enzymes of prostaglandin biosynthesis and metabolism. Coordinate regulation of expression by cytokines in gestational tissues: A review. *Prostagl Other Lipid Mediators* 57:243-257

Herschman HR (1996) Review : prostaglandin synthase-2. *Biochim Biophys Acta* 129:125-140

Hla T, Neilson K (1992) Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Nat Acad Sci USA* 89:7384-7388

Hong WK, Sporn MB (1997) Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 278:1073-1077

Hong SH, AVIS I, De Vos M, Martinez A, Treston M, Mulshine JL (1999) Relationship of Acid Metabolizing Enzymes Expression in Epithelial Cancer cell lines to the Growth Effects of Selective Biochemical Inhibitors. *Cancer Res* 59 (9):2223-8

Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS (2000) The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 275 (15):11397-11403

Huynh H, Alpert L, Alaoui-Jamali MA, Ng CY, Chan TW (2001) Co-administration of finasteride and the pure anti-oestrogen ICI 182,780 act synergistically in modulating the IGF system in rat prostate. *J Endocrinol* 171:109-118

Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T (1995) Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for IL-6 expression site and cAMP response element. *J Biol Chem* 270:24965-24971

Isaacs JT (1983) Prostatic structure and function in relation to the etiology of prostatic cancer. *The Prostate* 4:351-366

Jacobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B (1999) Identification of a human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7230-7225

Jenster G (1999) The role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer. *Semin Oncol* 26(4):407-421

Johnston SD, Kamolpatana K, Root-Kustritz MV, Johnston GR (2000) Prostatic disorders in the dog. *An Reprod Sci* 60-61:405-415

Jones HE and coll.(1997) Comparatives Studies of the mitogenic Effects of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- α and the Expression of Various Growth factors in Neoplastic and Non Neoplastic Prostatic Cell Lines. *The Prostate* 30:219-231

Kim Y, Fisher S (1998) Transcriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 in Mouse Skin Carcinoma cells. *J Biol Chem* 273(42):27686-94

Kojima M, Morisaki T, Izuhara K, Uchiyama A, Matsunari Y, Katano M, Tanaka M (2000) Lipopolysaccharide increases cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor- κ B activation. *Oncogene* 19(9):1225-1231

Koljak R, Järving I, Kurg R, Boeglin WE, Varvas K, Valmsen K, Ustav M, Brash AR, Samel N (2001) The basis of prostaglandin synthesis in coral. *J Biol Chem* 276(10):7033-7040

Kolonel LN, Nomura AMY, Cooney RV (1999) Dietary Fat and Prostate Cancer: Current Status. *J Natl Cancer Inst* 91:414-28

Kozaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T (1994) Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 221:889-897

Kraemer SA, Meade SA, DeWitt DL (1992) Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure : Identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 293:391-400

Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Hershman HR (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promotor-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase /cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266:12866-12872

Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384:644-648

Lalani E, Laniado ME, Abel PD (1997) Molecular and cellular biology of prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 16:29-66

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1999) Cancer statistics 1999. *CA Cancer J Clin* 49:8-13

Langenbach R, Loftin CD, Lee C, Tian H (1999) Cyclooxygenase-deficient mice. A summary of their characteristics and susceptibilities to inflammation and carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 889:52-61

Lee-Parritz DE, Lamb CR (1988) Prostatic adenocarcinoma with osseous metastases in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 192(11):1569-72

Lim JW, Kim H, Kim KH (2001) Nuclear Factor-Kb Regulates Cyclooxygenase-2 Expression and Cell Proliferation in Human Gastric Cancer Cells. *Lab Invest* 81:349

Liu J, Antaya M, 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 J, Antaya M, Boerboom D, Lussier JG, Silversides DW, Sirois J (1999) The Delayed activation of the prostaglandin G/H synthase-2 promoter in bovine granulosa cells is associated with down-regulation of truncated upstream stimulatory factor-2. *J Biol Chem* 274 (49):35037-35045

Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC (1998) NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and downregulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 58:4245-4249

Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Lee R, Holland JF, Levine AC (2000) Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. *J Urol* 164 (3 Pt 1):820-5

Lobaccaro JM, Boudon C, Umbroso S, Lechevallier E, Mottet N, Rebillard X, Sultan C (1997) 5 α -reductase et prostate. *Annales d'Endocrinologie (Paris)* 58 :381-392

Marks F, Furstenburger G (2000) Cancer chemoprevention through interruption of multistage carcinogenesis. The lessons learnt by comparing mouse skin carcinogenesis and human large bowel cancer. *Eur J Cancer* 36(3):314-29

Marks F, Muller-Decker K, Furstenberger G (2000) A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Toxicology* 153:11-20

McNeal JE (1980) The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate* 2:35-49

Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1999) Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 274(12):8328-8334

Mestre JR, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, Stapleton PP, Tanabe T, Daly JM (2001) Redundancy in the Signaling Pathways and Promoter Elements Regulating Cyclooxygenase-2 Gene Expression in Endotoxin-treated-Macrophage/Monocytic cells. *J Biol Chem* 276(6):3977-3982

Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S, Hayaishi O (1976) Purification of prostaglandin endoperoxide synthase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem* 251:2629-2636

Moore RA (1944) Benign Hypertrophy and Carcinoma Of The Prostate. Occurrence and Experimental Production In Animals. *Surgery* 16:152-167

Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, et al (1995) Prostaglandin synthase-2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83:473-482

Myers C, Koki A, Pamukcu R, Wechter W, Padley RJ (2001) Proapoptotic Anti-inflammatory Drugs. *Urology* 57(Suppl 4A):73-76

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79(4):1193-226 Review

Navone NM, Logothetis CJ, von Eschenbach AC, Troncoso P (1999) Model systems of prostate cancer: Uses and limitations. *Cancer Metastasis Rev* 17:361-371

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

Nikolic D, Van Breemen RB (2001) DNA oxidation induced by cyclooxygenase-2. *Chem Res Toxicol* 14(4):351-354

Nugent KP, Farmer KC, Spigelman AD, Williams CB, Phillips RK (1993) Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 80:1618-9

O'Banion MK, Winn VD, Young DA (1992) cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4888-4892

O'Banion MK (1999) Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* 13(1):45-82

O'Shea JD (1962) Studies on the canine prostate gland. Factors influencing its size and weight. *J Comp Pathol Ther* 72:321-331

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell* 87:803-809

Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, Taketo MM, Evans JF (2001) Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apc Δ 716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 61:1733-1740

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA and coll.(2000) Kinase regulation in inflammatory response. *Nature* 406:367-368

Pestili de Almeida EM, Piché C, Sirois J, Doré M (2001) Expression of Cyclooxygenase-2 in Naturally Occuring Squamous Cell Carcinomas in Dogs. *J Histochem Cytochem* 49 (7):867-875

Petrow V (1986) The dihydrotestosterone (DHT) hypothesis of prostate cancer and its therapeutic implications. *The Prostate* 9:343-361

Picot D, Loll PJ, Garavito RM (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandine H2 synthase-1. *Nature* 367:244-249

Porter AC, Vaillancourt RR (1998) Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 16:1343-1352

Prescott SM, Fitzpatrick FA (2000) Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1470(2):M69-M78

Putz T, Culig Z, Eder IE, Nessler-Menardi C, Bartsch G, Grunicke H, Überall F, Klocker H (1999) Epidermal growth factor (EGF) receptor blockade inhibits the action of EGF, insulin-like growth factor I, and a protein kinase A Activator on the mitogen-activated protein kinase pathway in prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 59: 227-233

Reddy BS, Hirose Y, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Paulson S, Seibert K, Rao CV (2000) Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res* 60:293-297

Root Kustritz MV, Klausner JS (2000) Prostatic diseases. Text book of Veterinary Internal Medicine 5th edition, pp. 1687-1697

Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, Reichardt JK, Yu MC, Feigelson H, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Henderson BE (1998) Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res* 58 (20):4497-504

Ruijter E, Van De Kaa C, Miller G, Ruiter D (1999) Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocrine Rev* 20(1):22-45

Russell PJ, Bennett S, Stricker P (1998) Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem* 44(4):705-723

Samuelsson B (2000) The discovery of the leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* 161(2):S2-S6

Sandberg AA (1980) Endocrine control and physiology of the prostate. *The Prostate* 1:169-184

Schmedtje JF, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS (1997) Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappa B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271:601-608

Shaw G, Kamen R (1986) A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46:659-667

Sheng H, Shao J, Dixon DA, Williams CS, Prescott SM, DuBois RN, Beauchamp RD (2000) Transforming growth factor- β 1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. *J Biol Chem* 275(9):6628-6635

Sheng H, Shao J, DuBois RN (2001) K-Ras-mediated Increase in Cyclooxygenase 2 mRNA Stability Involves Activation of the Protein Kinase B. *Cancer Res* 61:2670-2675

Sigal E (1991) The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *Am J Physiol* 260(4):L13-L28

Sirois J, Richards JS (1992) Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *J Biol Chem* 267:6382-8

Sirois J, Levy LO, Simmons DL, Richards JS (1993) Characterization and hormonal regulation of the promoter of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Identification of functional and protein-binding regions. *J Biol Chem* 268:12199-12206

Sirois J (1994) Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* 135:841-848

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* 138:4427-34

Smith WL (1989) The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action Review. *Biochem J* 259:315-324

Smith WL, Marnett LJ (1991) Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis (review). *Biochim Biophys Acta* 1083:1-17

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(52):33157-33160

Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL (1998) Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 273(16):9886-93

Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ (1996) Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 56:4424-4429

Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ (1997) Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216(2):201-10

Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ (1999) Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 274(16):10911-10915

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

Sugimora T (2000) Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 21 (3):387-395

Swinney GR (1998) Prostatic neoplasia in five dogs. *Aust Vet J* 76:669-7

Tazawa R, Xu XM, Wu KK, Wang L (1994) Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem biophys Res Commun* 203(1):190-199

Terracio L, Douglas WHJ, Pennachio D, Vena RL, Ofner P (1982) Primary Epithelial Cell Cultures Derived From canine prostate: Isolation, Culture, and Characterization. *Am J Anatomy* 164:311-332

Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr (1991) Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 325:1593-1596

Tjandrawinata RR, Hughes-Fulford M (1997) Up regulation of cyclooxygenase-2 by product-prostaglandin E2. *Adv Exp Med Biol* 407:163-70

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

Tremblay L, Hauck W, Nguyen LT, Allard P, Landry F, Chapdelaine A, Chevalier S (1996) Regulation and activation of focal adhesion kinase and paxillin during the adhesion, proliferation, and differentiation of prostatic epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol endocrinol* 10:1010-1020.

Tsujii M, DuBois RN (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cell* 83:493-501

Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN (1998)
Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*
93:705-716

Tsujii M, Kawano S, DuBois RN (1997) Cyclooxygenase-2 expression in
human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA*
94:3336-40

**Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow
RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ, III (1999)**
Cyclooxygenase-2 expression is upregulated in human pancreatic cancer.
Cancer Res. 59:987-990

Uotila P, Valve E, Martikainen P, Nevalainen M, Nurmi M, Harkonen P (2001)
Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human
prostate cancer. *Urol Res* 29:23-28

**Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, Steinbach G, Mendelsohn J, Kumar R
(1999)** Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. *Oncogene*
18(2):305-14

Van der Ouderaa FJ, Buytenhek M, Slikkerveer FJ, van Dorp DA (1977)
Purification and characterization of prostaglandin endoperoxide synthase from
sheep vesicular glands. *Biochim Biophys Acta* 487:315-31

Versteeg HH, van Bergen en Henegouwen PM, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP (1999) Cyclooxygenase-dependent signalling : molecular events and consequences. FEBS letters 445 (1):1-5

Von Eschenbach AC (1996) The biologic dilemma of early carcinoma of the prostate. Cancer 78:326-9

Wadleigh DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S, Herschman HR (2000) Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. J Biol Chem 275(9):6259-6266

Waters DJ, Bostwick DG (1997) The canine prostate is a spontaneous model of intraepithelial neoplasia and prostate cancer progression. Anticancer Res 17:1467-70

Waters DJ, Sakr WA, Hayden DW et coll., (1998) Workgroup 4: Spontaneous Prostate Carcinoma in Dogs and Nonhuman Primates. The Prostate 36:64-67

Waters DJ, Patronek GJ, Bostwick DG, Glickman LT (1996) Comparing the age at prostate cancer diagnosis in humans and dogs. J Natl Cancer Inst 88:1686-7

Wiese FW, Thompson PA, Kadlubar FF (2001) Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2. Carcinogenesis 22(1):5

Xie W, Herschman HR (1995) v-src induce PGHS-2 gene expression by activation of the c-jun N-terminal kinase and c-jun transcription factor. *J Biol Chem* 270:27662-27628

Xue XM, Sansores-garcia L, Chen XM, Matijevic-Aleksic N, Du M (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5292-5297

Yamamoto S, Yamamoyo K, Kurobe H, Yamashita R, Yamagushi H, Ueda N (1997) Transcriptional regulation off fatty acid cyclooxygenases-1 and -2. *Int J Tiss React.* XX(1):17-22

Yan Z, Subbaramaiah K, Camilli T, Zhang F, Tanabe T, McCaffrey TA, Dannenberg AJ, Weksler BB (2000) Benzo[a]pyrene induces the transcription of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275(7):4949-4955

Yasunaga Y, Shin M, Fugita MQ, Nonomura N, Miki T, Okuyama A, Aozasa K (1998) Different Patterns of p53 Mutations in prostatic Intraepithelial Neoplasia and Concurrent Carcinoma: Analysis of Microdissected Specimens. *Lab Invest* 78 (10):1275-1279

Yokoyama C, Takai T, Tanabe T (1988) Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. FEBS letters 231:347-351

Yokoyama C, Tanabe T (1989) Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. Biochem Biophys Res Commun 165:888-894

Yoshimura R, Sano H, Musuda C, Kawamura M, Tsubouchi Y, Chargui J, Toshimura N, Hla T, Wada S (2000) Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. Cancer 89(3):589-96

Zhao XY, Malloy PJ, Krishnan AV, Swami S, Navone NM, Peehl DM, Feldman D (2000) Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. Nature Med (6):703-706