

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ D'INHIBITEURS DE LA
CYCLOOXYGÉNASE DANS LE TRAITEMENT DE TUMEURS
MAMMAIRES CANINES *IN VIVO*

par

KARINE SONZOGNI-DESAUTELS

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

Décembre 2008

© Karine Sonzogni-Desautels, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

**ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ D'INHIBITEURS DE LA
CYCLOOXYGÉNASE DANS LE TRAITEMENT DE TUMEURS MAMMAIRES
CANINES *IN VIVO***

présenté par

KARINE SONZOGNI-DESAUTELS

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Malcolm Gains, président-rapporteur

Monique Doré, directrice de recherche

Marie-Ève Nadeau, membre du jury



Résumé

La cyclooxygénase-2 (COX-2) est surexprimée dans de nombreux cancers humains tels que les tumeurs colorectales et les tumeurs du sein ainsi que dans plusieurs cancers canins comme les carcinomes spinocellulaires et les tumeurs mammaires. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) inhibent spécifiquement (AINS sélectifs) ou non (AINS non-sélectifs) la COX-2 et des propriétés anticancer ont été attribuées à certains AINS. Les tumeurs mammaires canines représentent le cancer le plus fréquent chez la chienne intacte et peu de protocole chimiothérapeutique constitue un complément prometteur à la chirurgie. Le but de cette étude était d'évaluer l'efficacité de deux AINS dans le traitement de tumeurs mammaires canines dans un modèle murin. Une lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome mammaire canin (CMT-9) a été utilisée pour induire des xénogreffes dans le coussinet graisseux mammaire de souris athymiques. Les masses étaient mesurées aux deux jours et, lorsqu'elles avaient atteint 100 mm^3 , les souris étaient traitées quotidiennement avec 0.6 mg/kg de piroxicam (un AINS non-sélectif) ($n=13$), avec 6 mg/kg de deracoxib (un AINS sélectif) ($n=15$) ou avec une solution contrôle ($n=28$). L'immunohistochimie et l'immunobuvardage de type western ont confirmé que les xénogreffes exprimaient la COX-2. L'analyse statistique du volume des masses entre 0 et 24 jours de traitement a révélé qu'il n'y avait pas de différence significative entre les différents groupes (piroxicam vs contrôle, deracoxib vs contrôle et piroxicam vs deracoxib). Cependant, le volume des masses des souris traitées avec le piroxicam était 42% et 39 % moindre que celui des souris contrôles à 14-15 et

21-22 jours, respectivement. En conclusion, le deracoxib n'a eu aucun effet sur la croissance des xénogreffes. Des études supplémentaires avec une dose plus élevée de piroxicam seront nécessaires afin d'élucider l'effet anticancer potentiel du piroxicam sur les tumeurs mammaires canines.

Mots-clés: tumeurs mammaires canines, COX-2, piroxicam, deracoxib, AINS, xénogreffes mammaires, coussinet graisseux mammaire, cancer mammaire, chiens, prostaglandines

Summary

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is overexpressed in many cancers such as in human colorectal and breast tumors as well as in canine squamous cell carcinomas and mammary tumors. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit specifically (selective NSAID) or not (non-selective NSAID) COX-2, and anticancer properties have been attributed to some NSAIDs. Canine mammary tumors are the most frequent cancer in bitches and few chemotherapeutic protocols provide a valuable complement to surgery. The goal of this study was, therefore, to evaluate the efficacy of two NSAIDs in the treatment of canine mammary tumors in a murine model. CMT-9, a cell line derived from a malignant canine mammary tumor, was used to induce mammary fat pad xenografts in nude mice. Tumors were measured every other day and, when they reached 100 mm³, mice were treated daily with 0.6 mg/kg of piroxicam (a non-selective NSAID) (n= 13), 6 mg/kg of deracoxib (a selective NSAID) (n=15) or a control solution (n=28). Immunohistochemistry and western blot analyses confirmed that CMT-9 xenografts expressed COX-2. Statistical analysis of tumor volumes between Day 0 and Day 24 of treatment showed that there was no significant difference between all groups (deracoxib vs control, piroxicam vs control and piroxicam vs deracoxib). However, a 42% and 39% reduction in tumor volume was present at Days 14-15 and Days 21-22, respectively, for the piroxicam-treated mice. In conclusion, deracoxib had no effect on tumor growth in this model. Additional studies should be conducted using a higher dose of piroxicam to better elucidate its potential anticancer effect on canine mammary tumors.

Keywords: canine mammary tumors, COX-2, piroxicam, deracoxib, NSAID, mammary xenografts, mammary fat pad, mammary cancer, dogs, prostaglandins

Table des matières

Résumé	iii
Summary	v
Table des matières	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements	xii
Introduction	1
Recension de la littérature	4
1. La cyclooxygénase (COX)	4
1.1. L'action de la COX	4
1.2. Les isoformes de la COX	5
1.3. L'implication de la COX et de la PGE ₂ dans les cancers.....	7
2. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)	13
2.1. Le métabolisme et la cible d'action des différents AINS.....	13
2.2. Les études épidémiologiques et l'effet anticancer des AINS.....	15
2.3. Les fondements de l'effet anticancer des AINS	18
3. Les différents cancers et la COX-2	22
3.1. La COX-2 et le cancer du côlon chez l'humain	22
3.2. La COX-2 et le cancer du sein	25
3.3. La COX-2 et le cancer mammaire chez la chienne	27
4. Les tumeurs mammaires canines.....	29
4.1. La prévalence et l'incidence du cancer mammaire chez la chienne.....	29
4.2. La classification des tumeurs mammaires canines.....	30
4.3. Les options thérapeutiques contre les tumeurs mammaires canines	32
4.4. La pathogénie du cancer mammaire canin	33

5. Les modèles <i>in vivo</i> de cancers mammaires.....	35
5.1. Les souris immunosupprimées.....	35
5.2. Les études <i>in vivo</i> impliquant la glande mammaire murine.....	36
Objectif	42
Article : Effect of cyclooxygenase inhibitors in a xenograft model of canine mammary tumors	43
Abstract	45
Introduction.....	47
Materials and methods	49
Results.....	54
Discussion.....	57
Acknowledgements.....	63
References.....	64
Figures	73
Discussion	83
Conclusion.....	92
Bibliographie	95

Liste des figures

Recension de la littérature

Figure 1 : Cascade de l'acide arachidonique.....	4
Figure 2 : Caractéristiques de la COX-1 et de la COX-2.....	5
Figure 3 : Rôles de la PGE ₂ dans la cancérogénèse	11
Figure 4 : Effets anticancer du célécoxib	21
Figure 5 : Glande mammaire de la souris.....	39
Figure 6 : Dissection de la glande mammaire de la souris.....	39
Figure 7 : Position des glandes mammaires de la souris.....	40

Article

Figure 1 : CMT9 xenografts and metastases in nude mice	74
Figure 2 : COX-2 expression in CMT-9 cell line and in CMT-9 xenografts in nude mice.....	76
Figure 3 : COX-2 expression in CMT-9 xenografts.....	78
Figure 4 : Tumor volume of deracoxib and control groups at different time points...	80
Figure 5 : Tumor volume of piroxicam and control groups at different time points ..	82

Liste des sigles et des abréviations

AINS : anti-inflammatoires non-stéroïdiens

ANOVA : «analysis of variance»

APC : «adenomatous polyposis coli»

Cellules NK : cellules «natural killer»

CMT-9 : «canine mammary tumor-9»

COX : cyclooxygénase

COX-1 : cyclooxygénase-1

COX-2 : cyclooxygénase-2

COX-3 : cyclooxygénase-3

DAB : 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

DEDTC : «diethyldithiocarbamic acid»

FAP : «familial adenomatous polyposis»

HEPS : «hematoxylin-eosin-phloxin-saffron»

IgG : immunoglobuline G

LPS : lipopolysaccharides

MAPK : «mitogen-activated protein kinase»

MMP-2 : métalloprotéinase membranaire 2

MMPs : métalloprotéinases matricielles

MMTV : «mouse mammary tumor virus»

MT-MMP-1 : métalloprotéinase de type membranaire 1

NF- κ B : facteur nucléaire- κ B

NSAIDs : «nonsteroidal anti-inflammatory drugs»

PBS : «phosphate-buffered saline»

PDK-1 : kinase phosphoinositide-dépendent kinase 1

PGD₂ : prostaglandine D₂

PGE₂ : prostaglandine E₂

PGF_{2α} : prostaglandine F_{2α}

PGG₂ : prostaglandine G₂

PGH₂ : prostaglandine H₂

PGI₂ : prostacycline

PHS ou PGHS : prostaglandine H₂ synthétase

PKB/Akt : protéine kinase B

SCID : «severe combined immunodeficiency»

Souris Nu/Nu : souris athymiques ayant un gène *Foxn1* altéré

TBS : «Tris-buffered saline»

TNF-α : facteur nécrosant de tumeur

TXA₂ : thromboxane A₂

UGTs : «uridine-5'-diphosphate(UDP)-glucuronosyltransferases»

VEGF : «vascular endothelial growth factor»

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement docteure Monique Doré pour sa disponibilité, son écoute, sa compréhension et sa gentillesse à mon égard. Je lui suis reconnaissante de m'avoir offert d'accomplir ce projet avec des souris athymiques qui me tenait tant à coeur. La belle collaboration qui s'est alors installée entre nous fut particulièrement agréable. Travailler pour docteure Monique Doré fut un honneur et un plaisir.

Je suis très reconnaissante envers madame Danielle Rannou, la technicienne de docteure Monique Doré, pour sa collaboration lors de mes recherches. Son assistance et son aide furent très appréciées ainsi que ses précieux conseils.

J'ai aussi beaucoup de gratitude pour madame Mélanie Michaud pour les soins prodigués à nos souris en mon absence et pour sa collaboration dans notre projet. Je remercie aussi monsieur Guy Beauchamp pour son aide à l'analyse statistique de nos résultats.

Je souhaite adresser un grand merci à tous ceux, dans l'entourage de la Faculté de médecine vétérinaire, qui m'ont aidée, de près ou de loin, à réaliser mon projet.

Je tiens aussi à remercier de tout coeur ma mère madame Yasmine Sonzogni et ma grand-mère madame Laurence Sonzogni pour m'avoir continuellement appuyée dans mes études universitaires.

Enfin, je suis très reconnaissante envers le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour ma bourse d'études supérieures du Canada ainsi qu'envers la Famille Auclair et la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal pour une bourse d'études.

Introduction

La cyclooxygénase (COX) est l'enzyme responsable de la conversion de l'acide arachidonique en PGH_2 qui sera, par la suite, métabolisée en différents prostanoides dont la PGE_2 (Levy, 1997). Deux isoformes de la COX ont été bien étudiées soit: la COX-1 qui est produite de manière constitutive par une majorité de cellules et la COX-2 qui est induite par des stimuli spécifiques (Kam, 2000). La COX-2 et la PGE_2 ont été impliquées dans l'inflammation et dans la cancérogénèse de nombreux cancers. En effet, en médecine humaine, plusieurs cancers surexpriment la COX-2 dont celui du côlon, du sein, des poumons, de l'estomac et du pancréas (Fitzpatrick, 2001). Le rôle de la PGE_2 dans la promotion de la formation de tumeurs a été prouvé, entre autres, pour le cancer du sein, du côlon et de la vésicule biliaire (Rolland, 1980; Marnett, 1992; Asano, 2002). La PGE_2 a pour effet de stimuler la prolifération cellulaire, d'inhiber l'apoptose, de favoriser l'angiogénèse tumorale, de promouvoir l'invasion dans les tissus adjacents et de modifier la réponse immunitaire favorisant ainsi la survie des cellules tumorales (Krysan, 2005; Sheng, 1998; Seno, 2002; Tsujii, 1997; Howe, 2003).

En médecine vétérinaire, plusieurs cancers canins surexpriment aussi la COX-2 tels que les adénocarcinomes mammaires, les carcinomes spinocellulaires, les carcinomes des cellules transitionnelles de la vessie et les carcinomes des cellules rénales (Doré, 2003; Pestili de Almeida, 2001; Mutsaers, 2005; Khan, 2001). D'ailleurs, parmi les tumeurs canines, des concentrations élevées de PGE_2 ont été rapportées pour le carcinome des cellules transitionnelles de la vessie, le mélanome

oral, le carcinome spinocellulaire oral, l'adénocarcinome mammaire, l'ostéosarcome et le carcinome prostatique (Mohammed, 2002; Mohammed, 2001).

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) inhibent la COX et sont classés selon qu'ils inhibent les deux isoformes de la COX ou spécifiquement la COX-2. Les AINS sélectifs pour la COX-2 auraient moins d'effets secondaires gastro-intestinaux que les AINS non-sélectifs qui inhibent la COX-1 responsable du maintien de l'homéostasie cellulaire. Plusieurs études épidémiologiques ont évalué de manière rétroactive ou prospective les effets de différents AINS sur la progression de divers cancers. Les résultats les plus concluants sont ceux portant sur le cancer du côlon en médecine humaine où il a été rapporté, dans une étude prospective, que la prise régulière d'aspirine, un AINS non-sélectif, peut diminuer le risque de cancer colorectal métastatique et fatal de 50% (Giovannucci, 1994). Cependant, les études portant sur d'autres cancers tel que le cancer du sein chez la femme sont plus nuancées (Jacobs, 2005; Harris, 2003; Johnson, 2002; García Rodríguez, 2004).

Les tumeurs mammaires constituent le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la chienne intacte affectant 198 cas par 100 000 chiennes annuellement (Meuten 2002; Tilley, 2004; Merlo, 2008). Entre 35% et 50% de ces tumeurs sont malignes, elles peuvent alors potentiellement métastasier à distance et, en conséquence, elles s'accompagnent d'un pronostic réservé à sombre (Fossum, 2002; Ogilvie, 1995; Withrow, 2007). Les protocoles chimiothérapeutiques offrent un certain espoir, mais la chirurgie demeure la seule option thérapeutique valable actuellement, bien qu'elle ne soit pas recommandée dans certains cas trop avancés. La possibilité d'envisager d'autres avenues thérapeutiques serait donc souhaitable. Il a été rapporté que 56% des adénocarcinomes mammaires canins surexpriment la

COX-2 (Doré, 2003). De plus, la COX-2 est exprimée de façon plus intense dans les adénocarcinomes que dans les adénomes mammaires canins (Doré, 2003). Ainsi, les AINS pourraient constituer une avenue thérapeutique contre ce cancer et la présente étude a donc pour prémisse d'établir un modèle murin de tumeurs mammaires canines. Puis, à l'aide de ce modèle, cette étude a pour objectif d'évaluer l'efficacité d'inhibiteurs de la COX (en l'occurrence, le piroxicam, un AINS non-sélectif, et le deracoxib, un AINS sélectif pour la COX-2) dans le traitement de tumeurs mammaires canines *in vivo*.

Recension de la littérature

1. La cyclooxygénase (COX)

1.1. L'action de la COX

L'acide arachidonique est un acide gras essentiel présent dans les cellules (Smith, 2008). Il est métabolisé en PGG_2 par la cyclooxygénase et la PGG_2 est ensuite réduite en PGH_2 (Levy, 1997). Cette dernière étape est effectuée par une peroxydase. Les actions cyclooxygénase et peroxydase sont associées à la même enzyme qu'on appelle la prostaglandine H_2 synthétase (PHS ou PGHS) (Levy, 1997; Smith, 2007).

Certains auteurs semblent préférer utiliser le terme PGHS alors que l'appellation COX pour identifier cette même enzyme est extrêmement répandue (Vane, 1998a). La PGH_2 est ensuite métabolisée en $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 , PGE_2 , PGI_2 (ou prostacycline) et TXA_2 (ou thromboxane A_2) (Figure 1) (Levy, 1997). Ces cinq prostanoides sont donc

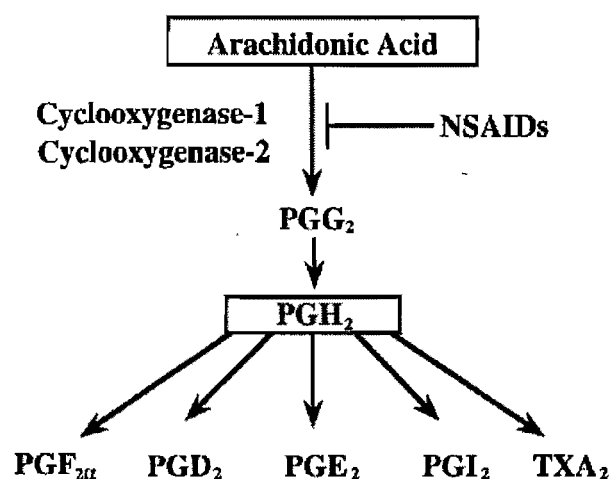


Figure 1: Cascade de l'acide arachidonique

Figure tirée de Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal* 1998; 12: 1063-73.

le résultat de l'action de la cyclooxygénase qui est considérée comme l'enzyme limitante à la production de ces prostaglandines.

1.2. Les isoformes de la COX

La COX a été clonée en 1988 et a fait l'objet de nombreuses études jusqu'à ce jour (DeWitt, 1988; Merlie, 1988; Yokoyama, 1988). Il existe deux isoformes: la COX-1, qui est dite constitutive, est l'isoforme qui assume des fonctions physiologiques normales, responsable du maintien de l'homéostasie, et la COX-2 qui est induite par des stimuli inflammatoires (Kam, 2000). La COX-1 a été purifiée en

	COX-1	COX-2	
Expression	Constitutive	Inducible	1976, alors que la
Size of gene	22 kb	8.3 kb	COX-2 a été identifiée
mRNA transcript	2.7 kb	4.5 kb, with multiple Shaw-Kamen sequences	en 1989 (Miyamoto,
Size of protein	72 kDa	72/74 kDa doublet	1976; Simmons, 1989).
Localisation	Endoplasmic reticulum, nuclear envelope	Endoplasmic reticulum, nuclear envelope	Ces deux isoformes
Expression pattern	Most tissues, including stomach, kidney, colon and platelets	Regions of brain and kidney, activated macrophages, synoviocytes during inflammation, malignant epithelial cells. Expression stimulated by cytokines, growth factors, oncogenes and tumour promoters	possèdent une grande homologie et un poids moléculaire semblable (Figure 2) (Vane, 1998a).

Figure 2 : Caractéristiques de la COX-1 et de la COX-2

Figure tirée de Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM and Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine-related cancer* 2001; 8: 97-114.

Récemment, une troisième isoforme, la COX-3, a été identifiée. La nature de cette isoforme est toutefois sujette à controverse et un nombre limité d'études ont été publiées sur la matière (Chandrasekharan, 2002; Kis, 2005; Kis, 2006).

La COX-2 est presque indétectable dans les tissus normaux en absence d'inflammation, mais certaines exceptions existent où il est commun de retrouver de la COX-2 même en un état physiologique normal (Levy, 1997). En fait, elle entre en fonction dans la gestation et la parturition au niveau utérin et placentaire. La COX-2 est aussi présente de manière constitutive dans certains tissus nerveux tel le cerveau (Vane, 1998a). L'expression de la COX-2 peut être stimulée, lors d'inflammation, par des facteurs de croissance, des cytokines (comme l'interleukine-1), le lipopolysaccharide (LPS) bactérien, le facteur nécrosant de tumeur (TNF- α) ou d'autres médiateurs dans le but d'augmenter les concentrations de PGE₂ localement (Kam, 2000). Ce phénomène est d'ailleurs en cause lors d'arthrite et des auteurs ont démontré que, dans des modèles animaux et humains de problèmes inflammatoires des articulations, des taux élevés de COX-2 et de prostaglandines seraient incriminés (Stack, 2001; Dubois, 1998).

En fait, la COX-1 est produite de façon constante par plusieurs cellules dans l'organisme (Smith, 2007). Elle induit la production de prostaglandines cytoprotectives dans l'estomac et dans l'intestin qui sont responsables du maintien de l'intégrité cellulaire (Vane, 1998a). De plus, les prostaglandines produites suite à l'action de la COX-1 sont importantes dans les reins afin de préserver un bon débit vasculaire lorsque celui-ci est compromis par d'autres éléments. Il appartient aussi à

la COX-1 d'agir dans l'agrégation plaquettaire par la production de thromboxane A₂ (Fosslien, 2005).

1.3. L'implication de la COX et de la PGE₂ dans les cancers

Lorsque des cellules acquièrent des mutations génétiques leur accordant un avantage prolifératif, un clone de cellules peut finalement former une tumeur. Si, au sein de cette tumeur, la prolifération des cellules est encouragée, l'apoptose est inhibée, la surveillance par le système immunitaire est déjouée, une néovascularisation tumorale est établie, l'invasion des tissus adjacents est promue et la formation de métastases à distance est encouragée, alors il y a développement d'un cancer malin. Des conditions de croissance particulières et certains médiateurs peuvent soutenir cette progression tumorale. La COX-2 et la PGE₂ sont considérées comme des promoteurs de la cancérogénèse puisqu'elles jouent un rôle dans chacune de ces étapes (Weinberg, 2007; Asano, 2002; Krysan, 2005; Sheng, 2001).

Il est reconnu que de nombreux cancers en médecine humaine et en médecine vétérinaire surexpriment la COX-2. Les carcinomes et adénocarcinomes du côlon, les cancers du sein, les tumeurs des poumons et de l'estomac, les carcinomes spinocellulaires de la tête et du cou et le cancer du pancréas en sont des exemples en médecine humaine (Fitzpatrick, 2001). En médecine vétérinaire, les tumeurs mammaires, les carcinomes spinocellulaires, les carcinomes des cellules transitionnelles de la vessie et les carcinomes des cellules rénales sont des exemples de tumeurs qui surexpriment la COX-2 chez l'espèce canine (Doré, 2003; Pestili de Almeida, 2001; Mutsaers, 2005; Khan, 2001). Particulièrement, une analyse

immunohistochimique effectuée sur plus de 60 tumeurs humaines a permis de mettre en évidence que 90% des tumeurs du poumon, 71% des adénocarcinomes du côlon et 56% des cancers du sein présentaient une forte expression de la COX-2 (Soslow, 2000). En médecine vétérinaire, une étude a rapporté que la COX-2 était exprimée fortement et spécifiquement par tous les échantillons testés de carcinomes spinocellulaires chez le chien par opposition aux tissus sains (Pestili de Almeida, 2001).

La COX-2 aurait un impact indirect sur les cellules cancéreuses par sa production de prostaglandines. En fait, ces prostaglandines agiraient comme «catalyseurs» de la cancérogénèse, la prostaglandine E2 (PGE₂) est particulièrement incriminée pour la majorité des tumeurs. D'ailleurs, une étude sur le carcinome des cellules transitionnelles de la vessie chez le chien a révélé que la concentration en PGE₂ était augmentée de plus de 10 fois dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain (Mohammed, 2002). En addition au carcinome des cellules transitionnelles de la vessie du chien, des concentrations élevées de PGE₂ ont aussi été rapportées pour de nombreuses tumeurs canines dont 50% des mélanomes oraux, 70% des carcinomes spinocellulaires oraux, 38% des adénocarcinomes mammaires, 27% des ostéosarcomes et 83% des carcinomes prostatiques (Mohammed, 2001). En médecine humaine, il a été démontré depuis les années 1980 que plusieurs cancers produisent des concentrations élevées de PGE₂. D'ailleurs, la PGE₂ a été identifiée comme étant impliquée, entre autres, dans la promotion de la cancérogénèse du cancer du sein, du côlon et de la vésicule biliaire (Rolland, 1980; Marnett, 1992; Asano, 2002).

Dans une étude sur le cancer du sein chez la femme, la forte production de PGE₂ a été associée à la présence d'embolies de cellules cancéreuses, à des métastases

aux nœuds lymphatiques axillaires et à un potentiel métastatique élevé (Rolland, 1980). D'autres études ont confirmé que les tumeurs du sein malignes produisent davantage de PGE₂ que les tumeurs bénignes (Watson, 1985). Dans cette étude *in vitro*, il a été rapporté que la présence d'oestrogènes exogènes induit la production de PGE₂ par les tumeurs du sein positives aux oestrogènes (Watson, 1985). Plus récemment, il a été démontré que la PGE₂ peut stimuler la production d'oestrogènes qui va encourager la prolifération des cellules de certains cancers du sein (Brodie, 2001). Ainsi, la PGE₂ produite en grandes quantités par les tumeurs du sein malignes stimule la prolifération des cellules cancéreuses et cette constatation se duplique pour d'autres cancers humains. Effectivement, une étude portant sur des lignées de cancer du poumon différent du cancer du poumon à petites cellules («non-small cell lung cancer») a décrit que la PGE₂ stimule la prolifération cellulaire de ces cellules cancéreuses (Krysan, 2005). Au point de vue moléculaire, il a été démontré que la PGE₂ active la voie de la protéine kinase Erk qui est une protéine MAPK («mitogen-activated protein kinase») (Krysan, 2005). La protéine Erk activée peut ensuite phosphoryler différents facteurs de transcription qui vont initier une réponse génétique; par conséquent, la PGE₂ induit ainsi la prolifération cellulaire de ces cellules cancéreuses (Weinberg, 2007).

Une autre étude a rapporté que la PGE₂ augmente la capacité d'invasion et la survie des cellules de cancer du côlon humain (Sheng, 2001; Sheng, 1998). En fait, la PGE₂ a la faculté d'augmenter le niveau de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, ce qui a comme effet d'inhiber l'apoptose et de promouvoir la prolifération cellulaire (Sheng, 1998). Pour ce même cancer, une autre étude a décrit que la COX-2 peut aussi induire l'activation de métalloprotéinases matricielles, ce qui accorde aux

cellules cancéreuses le pouvoir d'envahir les tissus adjacents et de former des métastases à distance (Tsuji, 1997). Dans une expérimentation *in vivo* se basant sur un modèle murin de polypes intestinaux, il a été démontré que la COX-2 ainsi que la PGE₂ sont essentielles à la formation de microvaisseaux dans les tumeurs bénignes et malignes (Seno, 2002). Apparemment, la PGE₂ est alors impliquée dans la production de VEGF («vascular endothelial growth factor»), ce qui lui confère un rôle dans l'angiogénèse tumorale (Seno, 2002). Il a été décrit que cette induction de la néovascularisation est impliquée dans les premiers stades du développement tumoral et que cet effet de la PGE₂ peut être inhibé par l'administration d'AINS (Chang, 2004).

Outre son action sur les cellules cancéreuses et les cellules du stroma environnant, la PGE₂ a un impact sur d'autres populations cellulaires et il a été rapporté qu'elle peut inhiber la prolifération des cellules du système immunitaire conduisant ainsi à une réponse immunitaire déficiente envers les cellules tumorales (Howe, 2003). En effet, il a été décrit que la PGE₂ inhibe la production des cytokines qui stimulent le système immunitaire, la production de TNF- α , l'action des cellules dendritiques, la toxicité des cellules NK («natural killer») ainsi que la prolifération des lymphocytes B et T (Howe, 2003). D'ailleurs, une expérience *in vitro* accompagnée d'une étude *in vivo* avaient déjà prouvé que la PGE₂ inhibe l'activité des cellules NK et que celle-ci est rétablie lorsque les souris sont traitées avec un AINS (Brunda, 1980). En résumé, la cyclooxygénase, par l'intermédiaire de la PGE₂, induit la prolifération des cellules cancéreuses, accroît leur résistance à l'apoptose, augmente leur capacité d'envahir les tissus adjacents, favorise la néovascularisation

essentielle à la formation d'une tumeur et accorde aux cellules tumorales le privilège de pouvoir déjouer le système immunitaire de l'hôte. En ce sens, la figure 3 démontre schématiquement que la PGE_2 , par ses différentes actions locales, est au cœur de la progression tumorale.

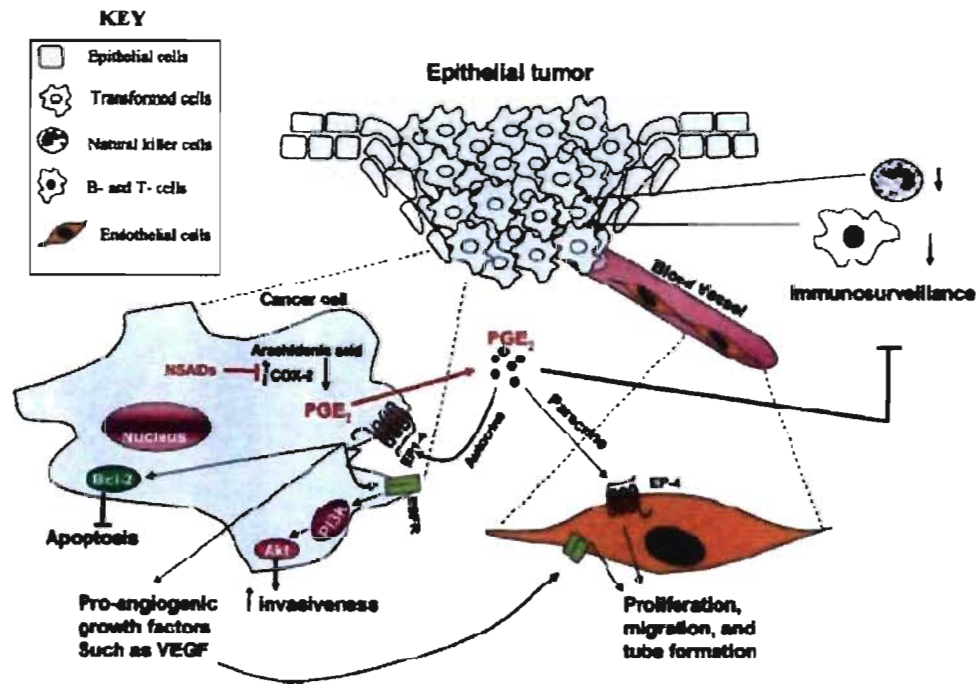


Figure 3 : Rôles de la PGE_2 dans la cancérogénèse

Figure tirée de Wang D and DuBois RN. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 415-6.

En addition, plusieurs des contributions de la COX-2 et de la PGE_2 dans la promotion de la cancérogénèse ont été révélées par des études sur les effets des AINS dans le traitement de divers cancers. Par exemple, certains auteurs ont étudié l'effet d'un traitement avec un AINS sélectif pour la COX-2 (méloxicam) sur la croissance tumorale de xénogreffes de carcinome hépatocellulaire humain chez la souris nue (Kern, 2004). Cette lignée cancéreuse exprime la COX-2 *in vitro* et l'étude *in vivo* a

permis de mettre en évidence un effet inhibiteur de cet AINS sur la croissance tumorale et la prolifération cellulaire ainsi qu'une promotion de l'apoptose sur les cellules de carcinome hépatocellulaire humain (Kern, 2004). Une autre étude *in vitro* a rapporté l'inefficacité du piroxicam, un AINS non-sélectif, à ralentir la progression tumorale de trois lignées de carcinome des cellules transitionnelles de la vessie humaine exprimant la COX-2 à des niveaux variables (Mohammed, 2006). Par contre, dans un modèle *in vivo* (souris athymiques), les xénogreffes de la lignée exprimant la COX-2 se sont révélées sensibles à l'action du piroxicam et la progression tumorale a été ralentie (Mohammed, 2006). Plusieurs années auparavant, ces auteurs avaient d'ailleurs publié l'efficacité du piroxicam seul ou à l'intérieur d'un protocole chimiothérapeutique pour ralentir la progression tumorale du carcinome des cellules transitionnelles de la vessie canine, un modèle animal de ce cancer chez l'humain (Knapp, 2000a; Knapp, 1994; Knapp, 2000b). Bien que l'efficacité du piroxicam dans la thérapie de ce cancer ait été prouvée à une dose de 0.3 mg/kg une fois par jour par voie orale, il semblerait impossible de prédire la réponse de chaque tumeur au traitement (Mutsaers, 2005). Enfin, lors de cette étude, deux chiens traités au piroxicam ont subi des effets secondaires gastro-intestinaux (Mutsaers, 2005). Dans une autre étude, certains chiens traités au piroxicam avaient subi des irritations gastro-intestinales ou une nécrose papillaire rénale asymptomatique observée lors de la nécropsie (Knapp, 1994).

2. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)

2.1. Le métabolisme et la cible d'action des différents AINS

Les AINS inhibent la COX en interagissant de façon réversible ou irréversible avec son site actif (Vane, 1998a). Les AINS ont un effet anti-inflammatoire par leur inhibition de l'action de la COX-2 et la majorité d'entre eux inhibent aussi la COX-1 (Kam, 2000). L'aspirine et le piroxicam sont deux exemples d'AINS qui inhibent principalement la COX-1. En fait, l'aspirine est rapportée pour inhiber 166 fois plus la COX-1 que la COX-2, alors que le piroxicam inhiberait 250 fois plus la COX-1 par rapport à son effet sur la COX-2 (Kam, 2000). Puisque la COX-1 a un rôle physiologique à jouer notamment au niveau des reins, des plaquettes, de la muqueuse gastro-intestinale et même au point de vue pulmonaire, il s'ensuit des effets secondaires restreignant l'usage de ces médicaments (Kam, 2000). Les AINS ont d'ailleurs comme effets secondaires principaux les atteintes rénales, les problèmes d'agrégation plaquettaire, les ulcérations et hémorragies gastro-intestinales qui sont explicables par la chute des taux de prostaglandines à cause de l'inhibition des cyclooxygénases (Vane, 1998a). Les ulcères et les hémorragies gastro-intestinales sont les effets adverses les plus préoccupants dans la mesure où cela peut nuire gravement à la santé du patient, même mettre sa vie en danger (Williams, 1999).

Dans les dernières années, de nombreux efforts ont été investis afin de développer des AINS dits plus «sécuritaires» pour le système gastro-intestinal. En effet, puisque les AINS qui inhibent la COX-1 sont incriminés dans la formation des ulcères gastro-intestinaux, il a été suggéré que les AINS qui inhibent sélectivement la

COX-2 n'auraient pas ces effets secondaires (Cryer, 1998). Ainsi, des AINS sélectifs pour la COX-2 ont fait leur apparition sur le marché comme le célécoxib en médecine humaine et le déracoixib en médecine vétérinaire. Les AINS sélectifs pour la COX-2 peuvent être jusqu'à 1000 fois plus actifs sur la COX-2 que sur la COX-1 (Kam, 2000). Cependant, selon certaines études, il serait faux de prétendre que les AINS sélectifs pour la COX-2 sont sans danger pour l'estomac. En effet, une étude dans un modèle humain *ex vivo* portant sur les 25 AINS qui étaient sur le marché lors de la conduite de l'étude, incluant des AINS dits sélectifs pour la COX-2, a permis de conclure que tous ces AINS peuvent conduire à la formation d'ulcères gastriques (Cryer, 1998). Même un AINS sélectif pour la COX-2 comme le diclofénac possède assez d'effet inhibiteur sur la COX-1 pour avoir un impact négatif sur la muqueuse gastrique (Cryer, 1998). Les connaissances actuelles obligent donc à garder un doute sur l'innocuité des AINS sélectifs pour la COX-2 et à utiliser avec précautions ces médicaments avec un suivi des patients à risque.

De plus, ces dernières années, les médias ont rapporté que les patients qui prennent des AINS sélectifs pour la COX-2 seraient plus à risque d'être atteints d'un accident vasculaire cérébral ou d'un infarctus du myocarde. Ce phénomène pourrait être attribuable à un déséquilibre entre la formation de la thromboxane (TXA₂) et celle de la prostacycline (PGI₂). La thromboxane a un effet thrombogénique et sa production est induite par la COX-1 (Fosslien, 2005). En fait, les AINS sélectifs pour la COX-2 inhiberaient la formation de prostacycline importante pour le maintien de l'intégrité vasculaire sans toutefois inhiber la production de thromboxane par les plaquettes. La résultante favoriserait un état prothrombotique et cet auteur conclut que l'interaction du médicament sur cette balance physiologique peut expliquer en

partie les risques plus élevés d'accidents cardiovasculaires chez ces patients (Fosslien, 2005).

2.2. Les études épidémiologiques et l'effet anticancer des AINS

Une étude épidémiologique conduite à Melbourne en Australie comprenant 715 cas de cancer colorectal a rapporté, en 1988, pour la première fois que l'aspirine pourrait avoir un effet protecteur contre le développement du cancer du côlon, du rectum ou du cancer colorectal (Kune, 2007). Par la suite, une étude épidémiologique américaine portant sur 662 424 adultes a démontré que le risque de mourir d'un cancer du côlon chutait si le patient avait consommé au moins 16 fois de l'aspirine par mois pendant un minimum d'un an (Thun, 1991). En effet, le risque relatif était alors de 0,60 pour les hommes et 0,58 pour les femmes (Thun, 1991). Donc, les patients qui prenaient régulièrement de l'aspirine avaient un risque de mourir d'un cancer du côlon de 40% à 50% moins élevé qu'un patient qui ne prenait pas d'aspirine.

D'autres auteurs ont ensuite obtenu des résultats en accord avec ceux de Thun. Certaines études ont d'ailleurs démontré que la prise d'au moins 2 doses d'aspirine par semaine diminuait le risque de cancer colorectal de 30% et le risque de cancer colorectal métastatique et fatal de 50% (Giovannucci, 1994). Leurs données leur permettent même d'affirmer que cet effet protecteur n'est pas lié à une détection précoce des cancers. Dans une étude épidémiologique s'étendant sur 12 ans, le risque de développer un cancer colorectal parmi les hommes âgés de moins de 65 ans qui prenaient de l'aspirine était diminué de 65% (Schreinemachers, 1994). Par ailleurs,

l'aspirine réduisait de 30% le risque de développer un cancer du poumon ou un cancer du sein chez la femme (Schreinemachers, 1994; Bosetti, 2002). Apparemment, l'aspirine aurait aussi un rôle protecteur contre le cancer des reins et du pancréas ainsi que contre la leucémie pour lesquels les risques relatifs rapportés sont de 0.60, 0.67 et 0.67 respectivement (Schreinemachers, 1994). En ce qui concerne les cancers des ovaires, de l'estomac et de l'œsophage, certaines études auraient montré un effet protecteur, mais les résultats ne sont pas aussi clairs que ceux obtenus pour le cancer colorectal (Bosetti, 2002).

D'autres auteurs ont rapporté des conclusions nuancées sur l'effet anticancer de l'aspirine. Il a été démontré qu'une faible dose quotidienne d'aspirine (81 mg) avait un certain effet protecteur contre les adénomes colorectaux alors que la dose habituelle (325 mg) n'en avait aucun (Baron, 2003). Une autre étude, s'échelonnant sur 10 ans et ayant pour but de tester l'utilisation d'aspirine à jours alternés (100 mg), a déterminé qu'il n'y avait aucun effet protecteur sur l'apparition du cancer du sein ou du cancer colorectal (Cook, 2005). Pour ce qui est du cancer du poumon, il semblerait y avoir une tendance non-significative à un certain effet protecteur (Cook, 2005). La durée du traitement avec l'aspirine semble aussi influencer les résultats des études. Ainsi, un effet protecteur contre le cancer colorectal n'était rapporté parmi les femmes qui prenaient couramment de l'aspirine qu'après au moins 10 ans de traitement (Chan, 2005). En addition, plus la dose d'aspirine était élevée, plus l'effet protecteur semblait important jusqu'à une réduction du risque de cancer colorectal de 53% (Chan, 2005). Néanmoins, les risques d'hémorragies gastro-intestinales suivant ce traitement à doses élevées impliquent que cette option n'est pas recommandée. Cette constatation d'effet anticancer dose-dépendant est d'ailleurs aussi concédée à

d'autres AINS selon cette étude avec une diminution du risque de cancer colorectal de 21% (Chan, 2005).

Concernant les études portant sur le cancer du sein chez la femme et l'effet protecteur des AINS, les résultats sont davantage mitigés. Dans une étude prospective portant sur 77 413 femmes et s'échelonnant sur 10 ans, aucun effet protecteur ne fut associé à la prise d'AINS ou plus spécifiquement d'aspirine (Jacobs, 2005). En fait, même pour un nombre de doses élevé (plus de 60 comprimés par mois) ou suite à de nombreuses années d'exposition au médicament, cette étude n'a pas démontré d'effet anticancer des AINS (Jacobs, 2005). Une autre étude a cependant permis de statuer sur un effet des AINS contre le cancer du sein (Harris, 2003). En effet, il a été découvert que la prise d'AINS pendant au moins cinq ans réduit l'incidence du cancer du sein de 21%, alors que lorsque le médicament est pris pendant plus de 10 ans, la réduction de l'incidence est de 28% (Harris, 2003). Par contre, l'utilisation de faibles doses d'aspirine n'a pas montré d'effet chimioprotecteur. D'ailleurs, Terry *et al.* ont rapporté que la diminution de l'incidence de cancer du sein suite à la prise d'aspirine n'était présente que chez les patientes dont les tumeurs expriment des récepteurs à oestrogènes (Terry, 2004). Cette variable (expression des récepteurs à oestrogènes) peut expliquer, en partie, la variation des résultats des différentes études. Une autre étude atteste l'effet anticancer de l'aspirine sur le cancer du sein chez la femme (Johnson, 2002). Il semblerait que les femmes avaient un risque de cancer du sein diminué de 29% si elles prenaient un comprimé d'aspirine par jour (Johnson, 2002). Mis à part l'aspirine, il ne semblerait pas y avoir d'effet protecteur des autres AINS contre le cancer du sein chez la femme (García Rodríguez, 2004).

Il a été suggéré que des différences interindividuelles génétiques pourraient expliquer l'effet anticancer variable des AINS (Ulrich, 2006). En fait, les AINS sont métabolisés au foie grâce à des enzymes telles que le cytochrome P450 et l'uridine-5'-diphosphate(UDP)-glucuronosyltransferases (UGTs) qui sont soumises à une variabilité génétique d'un individu à l'autre (Ulrich, 2006). Ce dernier élément pourrait donc expliquer, en partie, pourquoi l'effet anticancer des AINS n'est pas constant dans une population donnée. De plus, malgré l'importance de la COX-2 pour le cancer colorectal, il a été rapporté que certains de ces cancers n'expriment pas cette protéine et quelques auteurs ont travaillé sur les phénomènes épigénétiques qui pouvaient inhiber son expression (Toyota, 2000).

2.3. Les fondements de l'effet anticancer des AINS

Les AINS inhibent la cancérogénèse par trois moyens distincts. La première méthode serait par leur effet anti-inflammatoire rattaché à l'inhibition de la COX-2. En fait, certains cancers sont la conséquence d'une infection ou d'une irritation chronique sur un organe. Par exemple, les hépatites B et C prédisposent au carcinome hépatocellulaire, l'infection au papillomavirus humain peut engendrer un cancer du col de l'utérus, la bactérie *Helicobacter pylori* peut causer un adénocarcinome gastrique et les reflux gastriques peuvent même amener à un oesophage de Barrett qui prédispose au carcinome oesophagien (Coussens, 2002). Le microenvironnement au site des lésions est alors mis en cause et les médiateurs de l'inflammation (cytokines, interleukines, chemokines, protéases, radicaux libres, cyclooxygénases) recrutés pour combattre l'infection sont incriminés dans les dommages causés aux cellules de

l'organisme (Coussens, 2002). L'ADN des cellules peut ainsi être victime des radicaux libres; l'oxyde nitrique, par exemple, a été associé pour certains cancers à des mutations du gène *p53* (Hussain, 2003). Puis, les chemokines, produites au site d'infection dans le but d'attirer les leucocytes, mobilisent et activent les macrophages qui produisent de l'interleukine 10, une cytokine immunosuppressive, s'opposant ainsi à une réponse immunitaire favorable à la destruction des cellules tumorales (Balkwill, 2004). De plus, les macrophages activés et les cellules tumorales sécrètent du TNF- α qui induit la production d'oxyde nitrique causant des dommages à l'ADN, des métalloprotéinases matricielles (MMPs) favorisant la mobilité des cellules cancéreuses ainsi que du VEGF encourageant l'angiogénèse tumorale (Szlosarek, 2006). Ces phénomènes pourraient en partie expliquer la promotion de la cancérogénèse lors d'inflammation chronique. En somme, l'effet anticancer rapporté des AINS est parfois lié à leur effet anti-inflammatoire (Ulrich, 2006).

Deuxièmement, les AINS pourraient avoir une action anticancer directe par leur inhibition de la COX-2. Plusieurs auteurs accordent effectivement aux AINS un effet anticancer indépendant de leur effet anti-inflammatoire (Barnes, 2007; Kern, 2004). Par ailleurs, ce point de vue est partagé dans de nombreux articles relatant l'effet anticancer des AINS sur des tumeurs où l'inflammation chronique n'est pas reconnue pour avoir un rôle important dans la pathogénie du cancer (par exemple, cancer du sein ou cancer mammaire) (Connolly, 2002; Knapp, 1992). Comme ci-haut mentionné, ces études ont d'ailleurs permis de découvrir l'action de la COX-2 (ou plus particulièrement la PGE₂) dans la prolifération cellulaire, l'apoptose,

l'angiogénèse tumorale, l'invasion et la formation de métastases (Kern, 2004; Connolly, 2002; Krysan, 2005; Howe, 2005).

Troisièmement, d'autres auteurs croient que les AINS pourraient prévenir la cancérogénèse par un effet anticancer indépendant de leur effet anti-inflammatoire et de leur effet inhibiteur sur la COX (Goldberg, 1996; Li, 2001; Kundu, 2002). Kardosh *et al.* ont d'ailleurs effectué des études *in vitro* et *in vivo* avec un dérivé du célécoxib n'ayant pas d'action sur la COX-2 (Kardosh, 2005). Leurs résultats ont démontré que ce médicament avait autant d'effet anticancer que le célécoxib sur les cellules de lymphome de Burkitt (Kardosh, 2005). D'une part, des évidences suggèrent que certains AINS (le sulindac et le sulindac sulfide) ont un effet anticancer en bloquant les cellules cancéreuses en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Goldberg, 1996). D'autres auteurs ont confirmé que des AINS peuvent stopper la progression des cellules cancéreuses dans le cycle cellulaire (Shiff, 1996). Par la suite, d'autres études ont démontré que le célécoxib inhibe la protéine kinase B (PKB/Akt) ou la kinase phosphoinositide-dépendent kinase 1 (PDK-1), ce qui induit un arrêt de la progression dans le cycle cellulaire (Grösch, 2006). Apparemment, le célécoxib a aussi un certain effet sur des complexes CDK-cyclines et augmente la production de céramide aboutissant ultimement à un résultat similaire (Grösch, 2006). D'autre part, il a été observé qu'en présence de célécoxib, une diminution des protéines antiapoptotiques est notée ainsi qu'une augmentation des protéines proapoptotiques, un relâchement de cytochrome c de provenance mitochondriale et, finalement, une activation des caspases (Grösch, 2006). L'apoptose est donc promue suite au traitement avec cet AINS. De plus, utilisant des cellules de cancer du côlon, il a été prouvé qu'un traitement avec le NS-398 (un AINS sélectif pour la COX-2)

pouvait causer l'apoptose des cellules cancéreuses par le relâchement de cytochrome c par les mitochondries (Li, 2001). L'induction de l'apoptose par le célécoxib pourrait aussi être liée à son effet sur les récepteurs de mort («death receptors»), sur PKB/Akt, sur PDK-1, sur le céramide ou sur Ca^{2+} ATPase (Grösch, 2006). La figure 4 résume les différentes cibles d'action du célécoxib qui mettent en évidence les effets anticancéreux indépendants de la COX-2 de certains AINS.

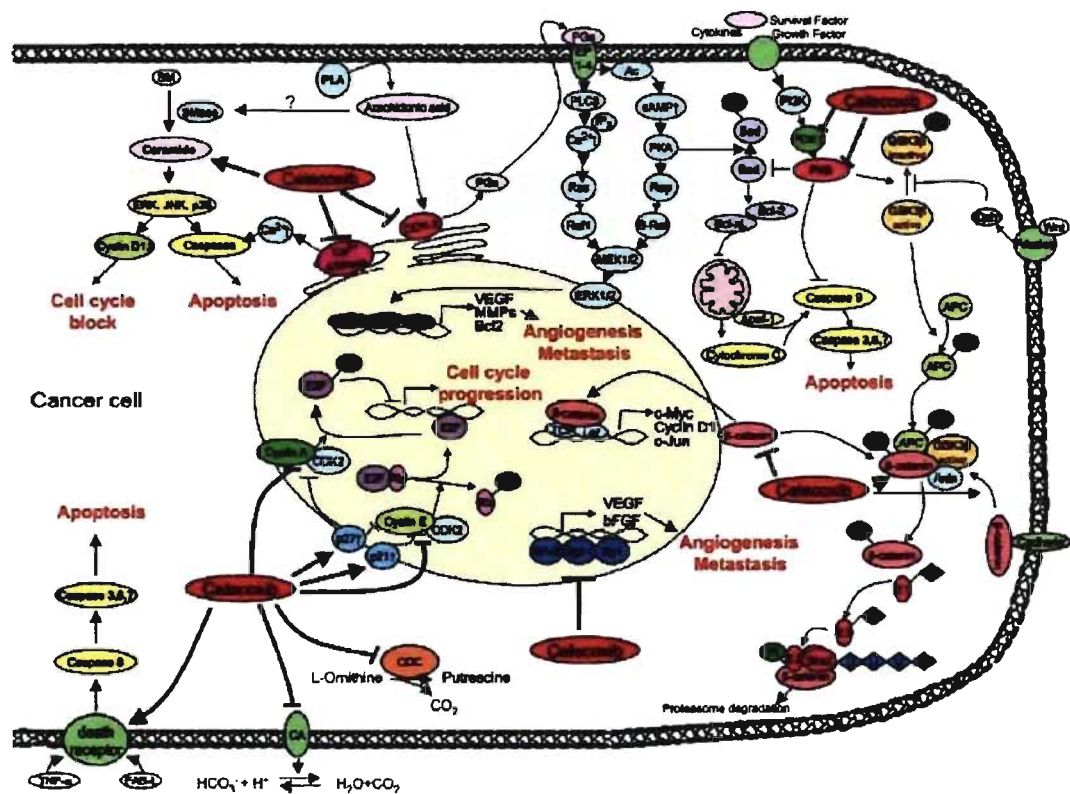


Figure 4 : Effets anticancer du célécoxib

Figure tirée de Grosch S, Maier TJ, Schiffmann S and Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; **98**: 736-47.

Enfin, dans une étude utilisant un modèle murin de cancer du sein, il a été démontré que des AINS (sélectif ou non-sélectif) inhibent de façon significative la croissance tumorale (Kundu, 2002). Dans cette étude, la croissance des tumeurs n'exprimant pas

la COX-2 était aussi inhibée par le célécoxib, suggérant un effet anticancer indépendant de la COX de cet AINS (Kundu, 2002).

3. Les différents cancers et la COX-2

3.1. La COX-2 et le cancer du côlon chez l'humain

Il apparaît, dès 1994, que la COX-2 a un rôle crucial à jouer dans la cancérogénèse du cancer colorectal humain. Suite à des analyses immunohistochimiques, il a été prouvé que les cellules de cancer du côlon humain expriment davantage la COX-2 que les cellules environnantes et que les cellules normales (Sano, 1995). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par des analyses de type northern grâce auxquelles des niveaux d'expression de la COX-2 nettement plus élevés dans les cellules cancéreuses ont été détectés par rapport aux tissus normaux qui sont, à proprement parlé, négatifs ou très faiblement positifs (Eberhart, 1994). Eberhart a aussi remarqué que 43% des adénomes colorectaux et 86% des adénocarcinomes colorectaux exprimaient de façon significative la COX-2 (Eberhart, 1994). En contrepartie, l'expression de la COX-1 était commune à tous les types de cellules du côlon humain, normales ou cancéreuses, mais était de très faible intensité (Sano, 1995; Eberhart, 1994). Ces observations sur l'expression de la COX-1 et de la COX-2 sont très similaires à ce qui est constaté pour le cancer des cellules transitionnelles de la vessie du chien (Khan, 2000).

Des cellules de cancer du côlon humain transfectées de manière à exprimer de façon constitutive la COX-2 présentent une activation de la métalloprotéinase membranaire 2 (MMP-2) et une induction de la métalloprotéinase de type membranaire 1 (MT-MMP-1) (Tsuji, 1997). Ces derniers changements leur concèdent une grande facilité à envahir les tissus adjacents et à former des métastases à distance (Tsuji, 1997). D'autre part, le traitement avec un AINS, le sulindac sulfide, évince l'effet de la transfection accordant, de ce fait, le nouveau phénotype à l'action de la COX-2 (Tsuji, 1997). Les connaissances actuelles en la matière accordent même un rôle à la PGE₂ dans la faculté des cellules de carcinomes colorectaux d'envahir les tissus adjacents (Sheng, 2001). Il a été rapporté qu'une lignée de cancer du côlon humain qui exprime fortement la COX-2 produit beaucoup de PGE₂ (Sheng, 1998). La PGE₂ aurait la capacité d'induire une augmentation du nombre de colonies de ces cellules, effet qui serait dépendant de la COX-2. En fait, la PGE₂ pourrait inhiber l'apoptose en augmentant le niveau de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, alors qu'un AINS sélectif pour la COX-2 induit l'apoptose des cellules de cancer du côlon humain (Sheng, 1998).

Il a aussi été établi que l'expression de la COX-2 par les cellules de cancers colorectaux humains est corrélée avec le degré de malignité de la tumeur. Les travaux de Sheehan sont d'ailleurs en accord avec ceux de Eberhart quant à l'expression de la COX-2 dans les cancers colorectaux humains (Sheehan, 1999). En addition, les tumeurs de taille importante qui sont de stade clinique avancé et qui offrent un taux de survie le plus bas sont celles qui expriment davantage la COX-2 (Sheehan, 1999). Inversement, les tumeurs colorectales exprimant fortement la COX-2 sont celles pour lesquelles le taux de survie du patient est le plus faible (Soumaoro, 2004). Il est

reconnu que les adénomes colorectaux ayant un taux de dysplasie élevé ont aussi une expression de COX-2 plus importante (Sato, 2003). Ensuite, dans le but de comprendre l'implication de la COX-2 dans la cancérogénèse, une expérience ayant pour objectif d'évaluer la prolifération cellulaire a été effectuée (Sato, 2003). En fait, plus la dysplasie cellulaire au sein de la tumeur était élevée, plus il y avait de prolifération. Cependant, lorsque la dysplasie était modérée à élevée, les tumeurs les plus prolifératives étaient celles qui exprimaient le plus la COX-2 (Sato, 2003). Ces résultats supportent un rôle de la COX-2 pour stimuler la prolifération cellulaire.

Un modèle de souris *Apc* knockout a été élaboré afin d'étudier la maladie familiale *polyposis coli* ou polyadénome colique à laquelle on réfère sous les abréviations APC pour «adenomatous polyposis coli» ou encore FAP pour «familial adenomatous polyposis» (Delamare, 2000; Weinberg, 2007; Oshima, 1996). Dans le cas de ces souris *Apc* knockout, il a été démontré qu'en traitant avec un AINS sélectif pour la COX-2, on obtenait une réduction plus importante du nombre de polypes intestinaux qu'avec un AINS non-sélectif (Oshima, 1996). Aussi, une étude génétique impliquant des souris *Apc* knockout où le gène de la COX-2 avait été annulé a démontré une atténuation du développement de polypes intestinaux (Oshima, 1996). Une autre expérience comprenant des souris *Apc* double knockout pour le gène du récepteur EP2 de la prostaglandine E_2 a démontré une diminution du nombre de polypes intestinaux (Sonoshita, 2001). Utilisant ce même modèle, une analyse a révélé que suite à la production de PGE_2 et à l'interaction entre la PGE_2 et son récepteur EP2, il y aurait production de VEGF et induction de l'angiogénèse tumorale (Seno, 2002).

3.2. La COX-2 et le cancer du sein

Plusieurs études ont rapporté une surexpression de la COX-2 dans le cancer du sein. Cependant, le pourcentage de tumeurs surexprimant la COX-2 varie grandement entre les études. Ainsi, une étude américaine portant sur le cancer du sein a révélé que moins de 5% des 44 biopsies analysées avaient une forte surexpression de la COX-2 (Hwang, 1998). Boland rapporte, quant à lui, 67% d'expression de la COX-2 pour les carcinomes *in situ* et 63% pour les tumeurs invasives alors que les tissus normaux en contenaient 23% (Boland, 2004). L'étude de Half et son équipe a rapporté que 63% des carcinomes *in situ* et 43% des cancers du sein invasifs surexprimaient la COX-2 (Half, 2002). En accord avec ces études, Denkert a trouvé que 36% des carcinomes du sein surexpriment la COX-2 et cette forte expression est associée à un taux de survie diminué (Denkert, 2003).

Denkert a rapporté que, pour le cancer du sein, l'expression élevée de COX-2 était significativement associée à plusieurs critères de malignité comme les métastases aux nœuds lymphatiques, l'anaplasie cellulaire, l'angiogénèse tumorale et l'absence de récepteur à œstrogène (Denkert, 2003). En ce sens, dans un modèle murin de cancer du sein, la COX-2 semble n'être exprimée que par les tumeurs produisant des métastases chez la souris (Kundu, 2001). Pour sa part, Subbaramaiah a observé que le récepteur tyrosine kinase HER2/neu (un des récepteurs du facteur de croissance épidermique) induit la surexpression de la COX-2 *in vitro* et que les tumeurs du sein qui sont HER2/neu positives surexpriment la COX-2 (Subbaramaiah, 2002). En fait, le récepteur HER2/neu induirait la transcription du gène de la COX-2 par l'intermédiaire de la voie des protéines Ras, Raf et des protéines kinases MAPK

(Subbaramaiah, 2002). Il a été rapporté que les cancers du sein présentant une amplification du gène codant pour la protéine HER2/neu ont un pronostic plus sombres que ceux qui ne présentent pas cette amplification génique (Weinberg, 2007). Une approche génétique a d'ailleurs démontré à l'aide de souris knockout que la COX-2 est importante dans la cancérogénèse et l'angiogénèse tumorale des cancers qui sont HER2/neu positifs (Howe, 2005). La PGE₂, quant à elle, est associée au caractère malin et métastatique de ces tumeurs et dépend de l'expression de la COX-2 (Kundu, 2001). Certains auteurs ont affirmé que la PGE₂ peut stimuler la production d'oestrogènes localement et promouvoir la cancérogénèse des tumeurs du sein répondant aux oestrogènes (Richards, 2002; Brodie, 2001; Brueggemeier, 1999). Enfin, l'étude de Ristimäki *et al.*, portant sur les cancers du sein invasifs, a associé la surexpression de la COX-2 à un haut grade histologique, à un taux de prolifération élevé, à une amplification de l'oncogène *HER2/neu* et à la présence de métastases aux nœuds lymphatiques axillaires (Ristimäki, 2002). En résumé, ces dernières conclusions ont permis d'établir une corrélation valable entre la surexpression de la COX-2 et les critères de malignité du cancer du sein.

Pour leur part, Liu *et al.* ont prouvé que la surexpression de la COX-2 était suffisante pour induire, à elle seule, la transformation tumorale des cellules mammaires (Liu, 2001). Pour ce faire, ils ont validé un modèle animal dans lequel le gène humain de la COX-2 se trouvait sous le contrôle du promoteur du virus MMTV («mouse mammary tumor virus») (Liu, 2001). Le virus MMTV est un virus à ARN transmissible de la mère aux souriceaux qui accorde une susceptibilité accrue au cancer mammaire (Weinberg, 2007). Une surexpression de la COX-2 était alors notée lors de la gestation et de la lactation des souris et une forte proportion des femelles

multipares étaient atteintes de dysplasie mammaire et de tumeurs mammaires métastatiques (Liu, 2001). Les auteurs ont associé cette prolifération cellulaire à une diminution de l'apoptose, ils ont d'ailleurs rapporté que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 était surexprimée dans ces tumeurs mammaires.

3.3. La COX-2 et le cancer mammaire chez la chienne

Selon une étude portant sur 63 adénomes mammaires canins et 84 adénocarcinomes mammaires canins, il a été démontré que la COX-2 était surexprimée dans 24% des adénomes et 56% des adénocarcinomes, alors que les tissus normaux étaient négatifs pour la COX-2 (Doré, 2003). De plus, l'expression de la COX-2 était aussi plus intense, selon cette étude, dans les adénocarcinomes que dans les adénomes mammaires canins (Doré, 2003). L'expression de la COX-2 par les carcinomes mammaires invasifs de la chienne a aussi été étudiée et 100% des tumeurs étudiées surexprimaient la protéine par rapport aux tissus normaux qui étaient tous négatifs pour la COX-2 (Millanta, 2006).

Dans une étude, on relate aussi que les tumeurs qui expriment davantage la COX-2 sont celles qui surexpriment HER2/neu, qui sont classées histopathologiquement comme étant plus malignes et qui sont associées à un pronostic plus sombre (Millanta, 2006). Une autre étude a permis de mettre de l'avant une corrélation entre le taux d'expression de la COX-2 dans la tumeur mammaire canine et son type histologique (Heller, 2005). En effet, les tumeurs qui exprimaient davantage la COX-2 étaient plutôt des carcinomes anaplasiques par opposition à des adénocarcinomes (Heller, 2005). D'ailleurs, il a été rapporté que 37.5% des

adénocarcinomes mammaires canins étudiés produisent des concentrations élevées de PGE₂ (Mohammed, 2001).

L'effet du traitement avec le piroxicam et le méloxicam sur une lignée de carcinome mammaire canin a déjà été déterminé (Knottenbelt, 2006). En fait, il est connu que ces AINS inhibent la prolifération de ces cellules *in vitro*, cependant les auteurs démontrent que cette action a lieu à des concentrations de médicament qui ne peuvent être atteintes *in vivo* (Knottenbelt, 2006). Par contre, une étude clinique a évalué l'effet du piroxicam dans le traitement des adénocarcinomes mammaires canins et une chienne sur trois a démontré une rémission partielle (Knapp, 1992).

Une étude *in vitro* a rapporté que des lignées cellulaires dérivantes de tumeurs mammaires canines spontanées avaient une expression variable de COX-2 (Brunelle, 2006). Ainsi, une de ces lignées surexprimait la COX-2, alors que les autres exprimaient peu ou pas cette protéine. La production de PGE₂ est en corrélation avec ces derniers résultats, puisque les taux de PGE₂ étaient significativement plus élevés pour la lignée cellulaire qui surexprimait la COX-2 (Brunelle, 2006). Il a aussi été démontré que le traitement de ces cellules avec un inhibiteur spécifique pour la COX-2, le NS-398, induit une chute dans la production de PGE₂ en plus de réduire la prolifération cellulaire (Brunelle, 2006). Ces observations suggèrent un rôle de la COX-2 dans les tumeurs mammaires canines.

4. Les tumeurs mammaires canines

4.1. La prévalence et l'incidence du cancer mammaire chez la chienne

Les tumeurs mammaires sont le cancer le plus fréquent chez l'espèce canine (Merlo, 2008). En fait, il a été mis en évidence que cette maladie est encore, de nos jours, une préoccupation importante puisqu'elle représente 70% de tous les cas de cancers chez la chienne (Merlo, 2008). L'incidence annuelle des tumeurs mammaires chez la chienne intacte est évaluée à 198 cas par 100 000 chiennes (Tilley, 2004; Meuten 2002). Un recensement prospectif effectué entre 1985 et 2002 à Genoa en Italie a mis en évidence une incidence de 191.8 cas de cancer mammaire par 100 000 chiennes-année à risque (Merlo, 2008). Une étude récente effectuée en Suède sur une population de chiennes assurées décrit même une incidence supérieure de 111 cas de réclamations par 10 000 chiennes-année à risque (Egenvall, 2005).

Parmi les cas de cancers mammaires, la très grande majorité sont des chiennes non stérilisées, alors qu'il est possible quoiqu'excessivement rare que des chiens mâles soient atteints (Tilley, 2004). En fait, les chiennes stérilisées ont été décrites pour avoir un risque de développer un cancer mammaire équivalent à 12% du risque d'une chienne intacte (Schneider, 1969). Cet auteur va plus loin dans son analyse en présentant que si la chienne est ovariectomisée avant le premier oestrus, son risque d'être atteinte de tumeurs mammaires est de 0.5%, si elle est opérée avant le deuxième oestrus, de 8%, et si elle est stérilisée après le deuxième oestrus, de 26% (Schneider, 1969). Ces données soulignent le caractère hormono-dépendant des cancers mammaires canins et certains auteurs présentent les stéroïdes ovariens,

particulièrement la progestérone, comme étant impliqués dans la formation de ces cancers (Withrow, 2007). Ces hormones favoriseraient la mitose cellulaire et seraient donc incriminées dans la promotion tumorale, bien que les adénocarcinomes invasifs semblent perdre leur dépendance à ces hormones par la perte des récepteurs à oestrogène et à progestérone (Withrow, 2007). D'autres auteurs affirment que l'hormone de croissance et la prolactine pourraient aussi avoir un rôle à jouer dans la cancérogénèse de ces tumeurs (Meuten, 2002).

Il est décrit que certaines races de chiennes sembleraient prédisposées telles les caniches, les bostons terriers, les fox terriers, les airedales, les teckels, les montagnes des pyrénées, les samoyèdes, les keeshonds ainsi que les pointeurs, les retrievers, les setters et les épagneuls (Fossum, 2002). D'autres auteurs, par opposition, prétendent qu'il n'existe aucune prédilection de races (Tilley, 2004). Enfin, d'autres rapportent que certaines races de chiens seraient moins affectées que les autres tels que les collies (Egenvall, 2005). Les chiennes sont atteintes de tumeurs mammaires en moyenne vers l'âge de 10 à 11 ans, mais certains cas ont été recensés dès l'âge de 5 ans (Tilley, 2004; Nelson, 2003). Selon une étude, jusqu'à 13% des chiennes assurées âgées de 10 ans sont diagnostiquées d'un cancer mammaire (Egenvall, 2005).

4.2. La classification des tumeurs mammaires canines

Les cancers mammaires chez la chienne peuvent d'abord être séparés en tumeurs bénignes et malignes. D'ailleurs, il a été rapporté qu'entre 35% et 50% des tumeurs mammaires canines sont malignes (Fossum, 2002; Ogilvie, 1995). D'autres

auteurs ont confirmé ces données en présentant que 41% à 53% des spécimens de masses mammaires soumis par des cliniques vétérinaires se sont révélés être des tumeurs malignes (Withrow, 2007). Les petites tumeurs bénignes n'étant pas portées à l'attention des vétérinaires, les études ne peuvent établir de statistiques plus précises (Meuten, 2002). Les adénomes complexes et les tumeurs bénignes mixtes sont les tumeurs mammaires bénignes les plus fréquentes chez la chienne (Meuten, 2002). Il existe aussi, entre autres, des adénomes simples et des fibroadénomes. Dans le cas des tumeurs mammaires malignes, il s'agit en très grande majorité d'adénocarcinomes, alors que les autres cas sont des sarcomes (fibrosarcomes, ostéosarcomes et carcinosarcomes) (Fossum, 2002). Parmi les adénocarcinomes, on retrouve les adénocarcinomes *in situ*, les adénocarcinomes complexes et les adénocarcinomes simples; les adénocarcinomes *in situ* étant les tumeurs malignes présentant le moins de comportements malins (Meuten, 2002). Les adénocarcinomes complexes sont fréquents chez les chiennes et sont composés de cellules épithéliales et de cellules myoépithéliales (Meuten, 2002). Les adénocarcinomes simples sont les tumeurs mammaires malignes les plus communes chez les chiennes et se séparent en trois principales catégories: les adénocarcinomes tubulopapillaires, les adénocarcinomes solides et les adénocarcinomes anaplasiques (Fossum, 2002). D'autres types d'adénocarcinomes sont aussi possibles, bien que plus rares. De plus, il existe des gradations de malignité (variables selon les auteurs) permettant de préciser l'image pathologique de chaque carcinome (Meuten, 2002; Withrow, 2007).

4.3. Les options thérapeutiques contre les tumeurs mammaires canines

La chirurgie est l'option thérapeutique valable contre les cancers mammaires canins actuellement (Fossum, 2002, Withrow, 2007). Plusieurs approches s'offrent au chirurgien selon les tumeurs, mais il faut d'abord prendre en compte l'état clinique du patient, car la présence de métastases pulmonaires lors de la présentation rend la chirurgie peu recommandable. Il est mentionné que lors de tumeurs mammaires multiples, une combinaison de plusieurs approches chirurgicales est alors à envisager (Fossum, 2002). S'il s'agit d'une petite masse nodulaire simple non infiltrante et non adhérente, alors une nodulectomie avec des marges d'au moins un à deux centimètres peut être envisageable (Withrow, 2007). Une masse simple qui s'extensionne légèrement dans les tissus avoisinants, mais qui n'implique qu'une seule glande mammaire peut être retirée par une mastectomie simple dans la mesure où des marges adéquates, exemptes de cellules cancéreuses en périphérie, peuvent être obtenues (Withrow, 2007). Cependant, s'il est question de plusieurs masses rapprochées au niveau de la même chaîne mammaire, alors il faut envisager une mastectomie régionale ou encore une mastectomie unilatérale (c'est-à-dire une résection complète de la chaîne mammaire) (Fossum, 2002). Si le noeud lymphatique inguinal se révèle positif à la cytologie ou si la glande mammaire attenante est affectée, alors ce noeud lymphatique inguinal doit être excisé en chirurgie (Withrow, 2007). Il a été démontré que 95% des chiennes atteintes d'un adénocarcinome mammaire ayant envahi les vaisseaux sanguins ou lymphatiques adjacents et/ou ayant formé des métastases au noeud lymphatique régional ont été atteintes de récurrence ou de métastases moins de deux ans après leur chirurgie (Gilbertson, 1983).

Les études présentent des résultats mitigés concernant l'efficacité de différents protocoles chimiothérapeutiques dans le traitement des cancers mammaires canins. Effectivement, une récente étude clinique a testé l'utilisation de doxorubicine et de docetaxel dans le traitement chimiothérapeutique post-opératoire de chiennes atteintes de tumeurs mammaires malignes invasives et a démontré que ce traitement n'avait pas d'influence sur la récurrence du cancer et la formation de métastases (Simon, 2006). Par contre, une étude portant sur 16 chiennes atteintes de cancer mammaire a révélé que la cyclophosphamide et que le 5-fluorouracil, administrés après la chirurgie, pourraient augmenter la survie des chiennes (Karayannopoulou, 2001).

4.4. La pathogénie du cancer mammaire canin

Du point de vue moléculaire, les cancers mammaires canins ont beaucoup de similitudes avec les cancers du sein chez la femme. Comme pour le cancer du sein, des récepteurs à oestrogènes ont été décrits dans les tumeurs mammaires canines et il est démontré que 61.9% des tumeurs mammaires canines (bénignes et malignes regroupées) expriment des récepteurs à oestrogènes (Boldizsár, 1992). D'autres rapports ont aussi noté une expression élevée de récepteurs à oestrogènes dans les tumeurs mammaires canines et humaines par rapport aux tissus sains (Kumaraguruparan, 2006). Puis, il est reconnu que les cellules métastatiques des tumeurs mammaires canines n'expriment plus ces récepteurs et que les chiennes avec les tumeurs mammaires n'exprimant pas ces récepteurs possèdent les taux de survie

les plus bas (Meuten, 2002). L'absence de récepteurs à oestrogènes sur les cellules des tumeurs mammaires canines est donc associée à un stade de maladie très avancé.

Le récepteur HER2/neu, intensément étudié dans le cancer du sein, s'est révélé être surexprimé dans de nombreuses tumeurs mammaires malignes chez la chienne (Ahern, 1996). De plus, il a été démontré que ces tumeurs canines qui expriment fortement la COX-2 surexpriment aussi HER2/neu (Millanta, 2006). L'analyse immunohistochimique de l'expression de cette protéine dans les tumeurs mammaires canines a démontré que 50% des tumeurs bénignes et 19.1% des tumeurs malignes expriment HER2/neu (Rungsipipat, 1999). En accord avec ces résultats, une autre étude immunohistochimique rapporte un taux de 17.6% de adénocarcinomes mammaires canins qui surexpriment HER2/neu (Martín de las Mulas, 2003).

Les protéines p53 et Bcl-2 ont aussi été décrites comme étant fortement exprimées dans les tumeurs mammaires canines et humaines (Kumaraguruparan, 2006). Plus particulièrement, il a été démontré que 20% des tumeurs mammaires bénignes et 30% des tumeurs mammaires malignes chez la chienne surexpriment la protéine p53 (Lee, 2004). Les auteurs rapportent une corrélation entre la présence de mutations de *p53* et la surexpression de la protéine p53, ces deux éléments étant associés à un caractère malin de la tumeur ainsi qu'à un sombre pronostic (Lee, 2004). D'autres études ont permis de mettre en évidence que 11% des tumeurs mammaires bénignes et 20% des adénocarcinomes mammaires canins possédaient une ou deux mutations du gène *p53* pouvant expliquer en partie la malignité de ces tumeurs (Muto, 2000).

5. Les modèles *in vivo* de cancers mammaires

5.1. Les souris immunosupprimées

Plusieurs études récentes en cancérologie sont basées sur un modèle animal, car les chercheurs se sont rendus à l'évidence que certaines expérimentations effectuées avec la participation d'organismes vivants sont parfois essentielles afin d'étudier l'image clinique réelle des cancers. Pour ce qui concerne le carcinome des cellules transitionnelles de la vessie canin, il fut évident que certains modèles *in vivo* étaient plus représentatifs de la réalité médicale que leur homologue *in vitro* (Mohammed, 2006). Jessani a même démontré que les taux de certaines enzymes produites par les cellules cancéreuses *in vivo* étaient différents de ceux produits *in vitro* (Jessani, 2005). Matsumoto, quant à lui, a prouvé une induction de l'expression de la COX-2 dans des xénogreffes d'une lignée cellulaire qui n'exprimait pas la COX-2 en laboratoire (Matsumoto, 2004).

Le modèle des souris immunocompromises est très utilisé dans la communauté scientifique particulièrement dans le domaine de la cancérologie. En fait, pour des raisons immunologiques, il est impossible de greffer un tissu d'une autre espèce à une souris immunocompétente puisque la xénogreffe sera rejetée. Il faut donc que l'individu receveur soit démuné de lymphocytes T fonctionnels d'où l'élaboration de lignées de souris immunosupprimées telles que les souris athymiques nues (ou Nu/Nu) et les souris SCID («Severe Combined Immunodeficiency»). Depuis plus de 30 ans, les expériences utilisant des xénogreffes de chien dans des souris nues ont permis d'étudier le comportement biologique de nombreux cancers canins dans

des conditions contrôlées (Oughton, 1974). Le premier article rapportant ce type de xélogreffe a démontré que l'essai avec l'ostéosarcome, le mélanome, le carcinome mammaire et la tumeur vénérienne transmissible fut un succès (Oughton, 1974).

Les souris nues ont un gène *Foxn1* altéré, ce dernier code pour un facteur de transcription qui est responsable de la maturation normale du thymus (Balciunaite, 2002). Le facteur de transcription FoxN1 serait aussi responsable de la croissance des poils expliquant ainsi le phénotype d'hypotrichose des souris nues. Les souris nues n'ont donc pas un thymus normal qui puisse permettre la maturation des lymphocytes T, ainsi ces souris sont immunocompromises et ne peuvent rejeter les greffes tissulaires (Balciunaite, 2002).

Pour ce qui est des souris SCID, la modification génétique porte sur le gène *Prkdc* qui code pour une protéine kinase dépendante de l'ADN (Jhappan, 1997). La recombinaison V(D)J est affectée par cette mutation et ces souris ne peuvent donc pas produire d'immunoglobulines fonctionnelles ni de récepteurs des lymphocytes T fonctionnels (Jhappan, 1997). Les souris SCID n'ont donc pas de lymphocytes B ou T fonctionnels, sont immunocompromises et ne peuvent pas non plus rejeter les greffes tissulaires.

5.2. Les études *in vivo* impliquant la glande mammaire murine

Certaines lignées de cellules cancéreuses ayant un comportement malin *in vitro* échouent à former des tumeurs chez la souris nue (Price, 1990b). D'ailleurs, certains cancers du sein chez la femme ne produiraient des tumeurs chez la souris athymique que dans 6% à 15% des cas (Mehta, 1993). Les chercheurs ont donc tenté

différentes approches afin d'augmenter le taux de formation de tumeurs et le fait de choisir un site dit «orthotopique» pour l'injection des cellules cancéreuses constitue une option prometteuse. Le terme «orthotopique» peut être défini comme ce qui est situé à sa place normale (Delamare, 2000). Janet E Price est une des scientifiques qui valorise le concept d'injection orthotopique chez la souris nue. Dès 1990, elle présentait le coussinet graisseux mammaire des souris nues comme un endroit de prédilection pour l'injection de cellules de cancer du sein chez la femme (Price, 1990a).

En effet, il a été rapporté que la glande mammaire des rongeurs peut être divisée en un tissu riche en glandes ainsi qu'en un tissu qui en est, a proprement parlé, dépourvu (Walden, 1998). Ce dernier a été popularisé sous l'appellation anglaise «mammary fat pad» qui pourrait être traduite en coussinet graisseux mammaire. L'injection des cellules de cancer du sein apportait des résultats nettement meilleurs lorsque celles-ci étaient injectées dans le coussinet graisseux mammaire que lorsqu'elles étaient injectées simplement sous-cutané (Price, 1990b). D'autres auteurs partagent cette vision et ont présenté que les cellules cancéreuses mammaires tendent à proliférer et à métastaser davantage dans le coussinet graisseux mammaire murin (Jessani, 2005). Les souris développaient alors des métastases principalement dans les nœuds lymphatiques et les poumons ainsi qu'occasionnellement dans les muscles, le cœur et le cerveau (Price, 1990a). Il fut dès lors accepté que ce site d'injection donne des résultats optimums pour ce type de cancer et plusieurs auteurs s'entendent sur le fait que l'interaction entre les cellules cancéreuses et le milieu hôte serait à l'origine de ces observations. En fait, lorsque ces cellules sont injectées dans le tissu sous-

cutané, la vascularisation semble être l'élément limitant à la prolifération tumorale (Price, 1990b).

Une transplantation orthotopique permettrait donc aux cellules d'évoluer dans un stroma qui correspond à leur besoin, ce qui promeut la progression tumorale et l'épanouissement des caractéristiques propres à la lignée tumorale (Jessani, 2005). Cet élément est particulièrement exact en ce qui concerne les cellules épithéliales mammaires pour qui l'interaction avec le stroma environnant semble important (Wicha, 1979). Une étude s'est d'ailleurs rendue compte que les taux de certaines enzymes produites par les cellules cancéreuses *in vitro* étaient différents de ceux produits *in vivo* (Jessani, 2005). Cette inhibition ou induction enzymatique est donc le fruit d'une sélection biologique due au microenvironnement dans lequel les cellules étaient implantées.

La glande mammaire chez la souris est très développée et compose une grande partie de l'espace sous-cutané. En effet, la glande mammaire murine est principalement constituée de tissus adipeux et est composée de cinq paires de glandes: trois paires thoraciques et deux paires inguinales. La figure 5 (page suivante) illustre la disposition de la glande mammaire lorsque la peau de l'abdomen est rabattue.

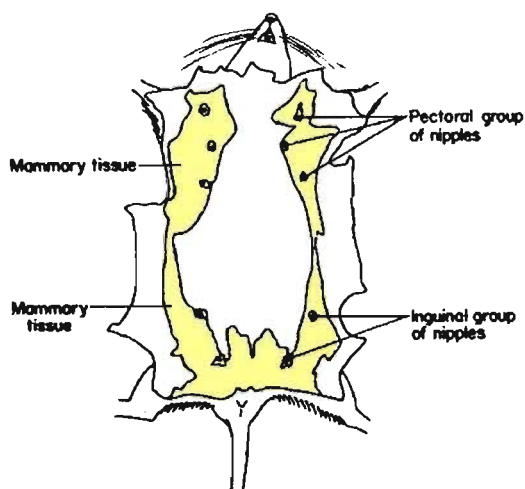


Figure 5 : Glande mammaire de la souris

Figure modifiée du site internet

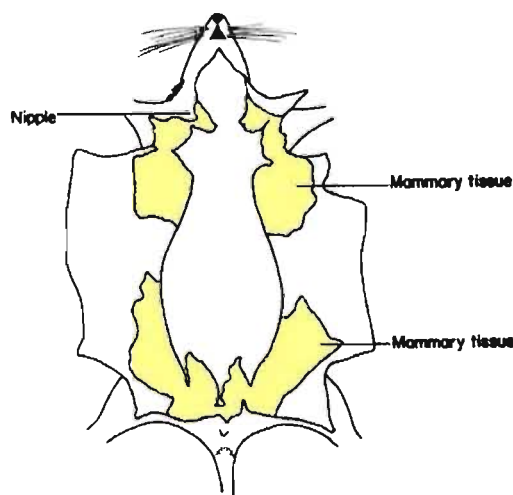
<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure50.shtml>

En disséquant ce tissu mammaire ventral lors de la nécropsie, on se rend compte que le tissu mammaire se prolonge dorsalement tel qu'illustré sur la figure 6.

Figure 6 : Dissection de la glande mammaire de la souris

Figure modifiée du site internet

<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure49.shtml>



La figure 7 (page suivante) indique la position des cinq paires de glandes mammaires. On constate que les trois paires crâniales se prolongent dorsalement à un tel point que les glandes mammaires #2 et #3 sont présentes juste caudalement à la scapula. Quant aux glandes mammaires inguinales, elles se prolongent caudalement jusqu'à délimiter le périnée.

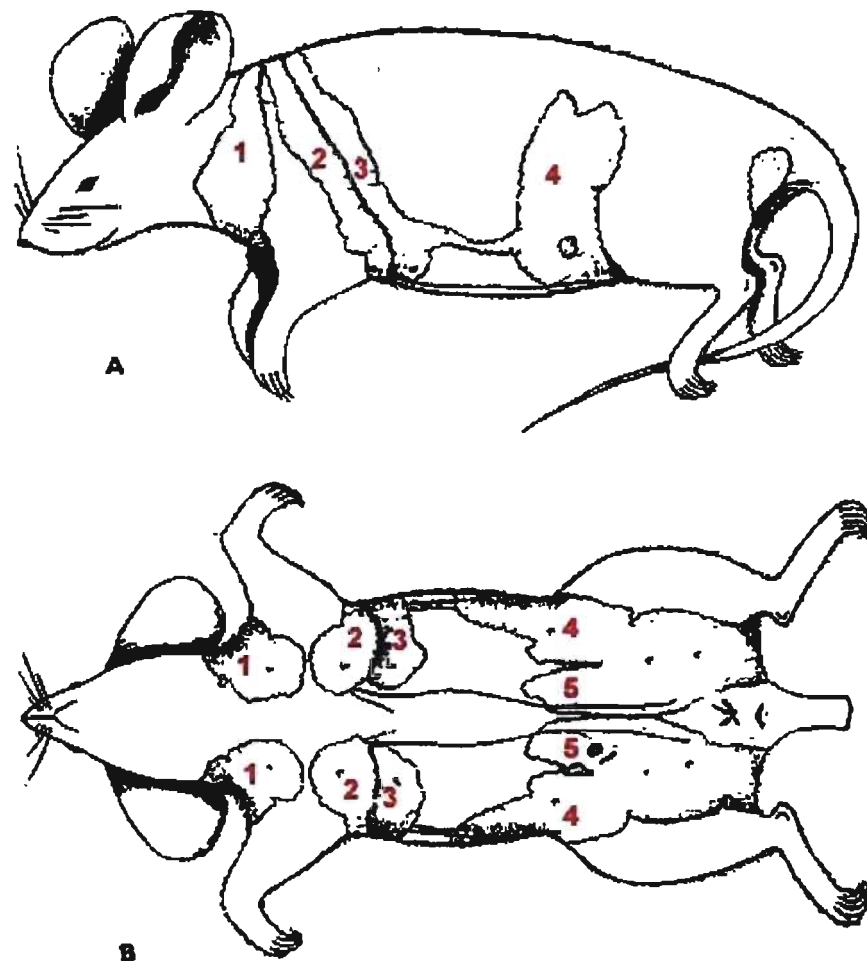


Figure 7 : Position des glandes mammaires de la souris

Figure modifiée du site internet <http://www3.niaid.nih.gov/labs/aboutlabs/cmb/InfectiousDiseasePathogenesisSection/mouseNecropsy/step3LymphNodesMammary.htm>

Dans les dernières décennies, plusieurs approches chirurgicales ont été rapportées pour les études impliquant la glande mammaire murine comme site d'implantation de cellules cancéreuses. En fait, cette pratique est connue depuis les années 1960 et Blair, Daniel, DeOme, Faulkin et Young furent les premiers à envisager cette technique (Deome, 1959; Daniel, 1968). L'objectif était alors de transplanter des tissus mammaires dans le coussinet graisseux mammaire d'une

glande mammaire inguinale (Deome, 1959). Par la suite, certains auteurs ont adopté une autre technique chirurgicale où une incision cutanée est pratiquée sur la face latérale du thorax (Price, 1990a). L'injection se fait alors dans le coussinet graisseux mammaire d'une glande mammaire thoracique (glande #2 ou #3 sur la figure 7) (Price, 1990a).

Une autre possibilité, afin de parer au faible taux de formation de tumeurs lors d'injections sous-cutanées de cellules cancéreuses chez la souris athymique, constitue la pratique d'utiliser du Matrigel lors de l'injection sous-cutanée de ces cellules. Celui-ci est composé, entre autres, d'héparan sulfate, de collagène IV et de laminine (Mehta, 1993). Lorsque les cellules de cancer du sein sont injectées avec du Matrigel, le taux de formation de tumeurs grimpe à 50% et la formation de métastases à distance est favorisée (Mehta, 1993). Les auteurs accordent cet effet à la faculté du Matrigel de devenir gélatineux à la température corporelle ce qui permet aux cellules cancéreuses de se développer dans un milieu restreint (Mehta, 1993).

Objectif

Les tumeurs mammaires constituent le cancer le plus fréquent chez la chienne et, actuellement, la chirurgie représente la seule option thérapeutique valable. Afin d'envisager d'autres avenues thérapeutiques, cette étude avait pour but d'élaborer un modèle murin du cancer mammaire canin. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité d'inhibiteurs de la cyclooxygénase dans le traitement de tumeurs mammaires canines *in vivo*.

Article

Effect of cyclooxygenase inhibitors in a xenograft model of canine
mammary tumors

Sonzogni-Desautels K., Knapp D.W., Sartin E. and Doré M.

Effect of cyclooxygenase inhibitors in a xenograft model of canine mammary tumors

Karine Sonzogni-Desautels¹, Deborah W. Knapp², Eva Sartin³ and Monique Doré¹,

¹Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire,
Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6,

²Department of Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Purdue
University, West Lafayette, Indiana 47907 and ³Department of Pathobiology,
College of Veterinary Medicine, Auburn University, Alabama 36849

Running Title: COX inhibitors and xenografts of canine mammary tumors

Corresponding author: Dr. M. Doré, Département de pathologie et microbiologie,
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe,
Québec, Canada J2S 7C6. Phone: [information retirée / information withdrawn] Fax: [information retirée /
information withdrawn]

E-mail: [information retirée / information withdrawn]

Abstract

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is overexpressed in many cancers such as in human colorectal and breast tumors as well as in canine squamous cell carcinomas and mammary tumors. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit specifically (selective NSAID) or not (non-selective NSAID) COX-2, and anticancer properties have been attributed to some NSAIDs. Canine mammary tumors are the most frequent cancer in bitches and few chemotherapeutic protocols provide a valuable complement to surgery. The goal of this study was, therefore, to evaluate the efficacy of two NSAIDs in the treatment of canine mammary tumors in a murine model. CMT-9, a cell line derived from a malignant canine mammary tumor, was used to induce mammary fat pad xenografts in nude mice. Tumors were measured every other day and, when they reached 100 mm³, mice were treated daily with 0.6 mg/kg of piroxicam (a non-selective NSAID) (n= 13), 6 mg/kg of deracoxib (a selective NSAID) (n=15) or a control solution (n=28). Immunohistochemistry and western blot analyses confirmed that CMT-9 xenografts expressed COX-2. Statistical analysis of tumor volumes between Day 0 and Day 24 of treatment showed that there was no significant difference between all groups (deracoxib vs control, piroxicam vs control and piroxicam vs deracoxib). However, a 42% and 39% reduction in tumor volume was present at Days 14-15 and Days 21-22, respectively, for the piroxicam-treated mice. In conclusion, deracoxib, a COX-2 selective NSAID, had no effect on tumor growth in this model. Additional studies should be conducted using a higher dose of piroxicam to better elucidate its potential anticancer effect on canine mammary tumors.

Keywords: canine mammary tumors, COX-2, piroxicam, deracoxib, NSAID, mammary xenografts, mammary fat pad, mammary cancer, dogs, prostaglandins

Introduction

Cyclooxygenase is the enzyme that metabolizes arachidonic acid into PGG₂ first, and then reduces PGG₂ to PGH₂ (Levy, 1997). PGH₂ is the substrate for the production of prostacyclin, thromboxan A₂ and prostaglandins such as PGE₂. There are two COX isoforms that have been recognized and well characterized (Miyamoto, 1976; Simmons, 1989). COX-1 is constitutively expressed in many tissues and is responsible for homeostasis (Howe, 2001). In contrast, COX-2 expression is induced following inflammatory stimuli and in neoplasia (Kam, 2000; Vane, 1998; Fitzpatrick, 2001; Doré, 2003). COX-2 is overexpressed in many human cancerous tissues such as in pulmonary, colon and breast cancers, as well as in some canine tumors like squamous cell carcinomas, transitional cell carcinomas of the urinary bladder, renal cell carcinomas and mammary carcinomas (Soslow, 2000; Pestili de Almeida, 2001; Mutsaers, 2005; Khan, 2000; Khan, 2001; Doré, 2003). In fact, COX-2 is overexpressed in the great majority of human colorectal adenocarcinomas and it was established that this enzyme has a crucial role in the pathogenesis of this cancer (Eberhart, 1994; Sano, 1995; Sheehan, 1999). Positive immunostaining for COX-2 is also common in human breast tumors (Boland, 2004; Half, 2002; Denkert, 2003). In dogs, we have recently reported that 24% of adenomas and 56% of mammary adenocarcinomas overexpress COX-2 (Doré, 2003). Other studies have found up to 100% of COX-2 positivity in canine mammary carcinomas (Millanta, 2006, Queiroga, 2007).

COX-2, through the action of PGE₂, acts on cancerous cells by inhibiting the host immune system and tumor cell apoptosis, increasing cell proliferation and

angiogenesis, and promoting invasion in adjacent tissues and metastasis (Howe, 2003; Seno, 2002; Sheng, 1998; Tsujii, 1997). The role of COX-2 on cancer promotion became evident with epidemiological studies on the impact of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) treatment on human colon cancer progression. Indeed, Thun *et al.* have shown a 40% lower colon cancer mortality rate when patients took aspirin regularly for at least one year (Thun, 1991). Another epidemiological study revealed that men younger than 65 years old regularly consuming aspirin had a 65% reduced risk of colorectal cancer (Schreinemachers, 1994). However, the chemoprotective role of NSAIDs on breast cancer is less clear (Jacobs, 2005; Terry, 2004; García Rodríguez, 2004). Relative risk reductions from 21% to 29% have been found in some studies (Harris, 2003; Johnson, 2002).

Mammary tumors constitute the most prevalent cancer in bitches (Merlo, 2008). Canine mammary tumors are hormonally dependent and approximately 62% of them express estrogen receptors (Schneider, 1969; Boldizsár, 1992). Surgery remains the only therapeutical choice, but many tumors recur after surgery and chemotherapeutic protocols offer little hope of a favorable outcome. Piroxicam, a non selective NSAID, has been tested in clinical trials against canine mammary cancer and one out of three dogs had a partial remission (Knapp, 1992). Piroxicam has been shown to inhibit cellular proliferation of canine mammary carcinoma *in vitro* (Knottenbelt, 2006) while canine mammary tumor cell proliferation as well as PGE₂ production were inhibited *in vitro* by NS-398, a selective COX-2 inhibitor (Brunelle, 2006). In view of these results, the aim of the present study was to use a xenograft model to evaluate the effect of COX inhibitors on the *in vivo* growth of canine mammary tumors.

Materials and methods

Cell line and cell culture

The CMT-9 cell line is derived from a malignant canine mammary tumor. This cell line has been well characterized (Wolfe, 1986; Brunelle, 2006). Cells were cultured in Leibovitz's L-15 medium (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (Invitrogen), 0.01M HEPES (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich LTD., Oakville, Ontario, Canada), 2 mM GlutaMAX (Invitrogen), 0.15% sodium bicarbonate (Invitrogen) and penicillin G (100 U/mL)-streptomycin (100 µg/mL) (Invitrogen). Cells were incubated in 75cm² flasks at 37°C in 5% CO₂. Cells for injections in nude mice were harvested after exposure to 0.25% trypsin-EDTA (Invitrogen), centrifuged at 800 X g for 5 minutes and resuspended in L-15 medium as to achieve a concentration of 5 millions CMT-9 cells/0.1 ml.

Xenografts in nude mice

Animal experimental protocols were approved by the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux of the Université de Montréal. Five to six-week old female nude mice were purchased from Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA, USA. After mice were anesthetised using isofluran, an incision was made ventrally and caudally to the left thoracic limb, and fine dissection was performed to visualize the mammary fat pad. Five million CMT-9 cells in a volume of 0.1 ml were injected into the cranial mammary fat pad, and two suture clips were put in place.

Mice were observed daily, weighed twice a week and tumors were measured with a digital caliper three times a week. When the tumor volume reached 1500 mm^3 (according to the formula: $\text{Volume} = \text{length} \times \text{width}^2/2$), the mouse was euthanized by CO_2 exposure. Mice whose tumors did not reach 1500 mm^3 by five weeks after the start of treatment were sacrificed at that time. During necropsy, half of the tumor was frozen for western blot analysis and the other half was fixed in 10% neutral buffered formalin. Fixed tissues were paraffin-embedded, and $3 \mu\text{m}$ -sections were cut and stained with hematoxylin-eosin-phloxin-saffron. Axillary lymph nodes, lungs, kidneys, spleen, liver and brain were evaluated for the presence of metastasis, kidneys were evaluated for the presence of papillary necrosis and the gastrointestinal system was evaluated for the presence of ulcerations.

Piroxicam and deracoxib treatment

Mice were randomly assigned to the four treatment or control groups ($n = 13$ to $15/\text{group}$). Treatment started when a tumor had reached a volume of 100 mm^3 . Treatment solution was given to mice once daily per os by gavage for a maximum of five weeks. The piroxicam treatment group received 0.6 mg/kg of piroxicam (Sigma-Aldrich) in water, the control piroxicam group received water only, whereas 6 mg/kg of deracoxib in polyethylene glycol 8000 (Fisher Scientific) was given to the deracoxib group and polyethylene glycol 8000 was given to the control deracoxib group. Deracoxib was a generous gift from Novartis, Animal Health Canada (Mississauga, Ontario, Canada).

Anti-COX antibodies

Antibodies MF241 and MF243 were generously provided by Dre Jilly F. Evans and Dre Stacia Kargman (Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Pointe-Claire, Québec, Canada). MF243 is a polyclonal antibody raised in rabbits against ovine placental COX-2. MF243 COX-2 selectivity has been previously reported in various species (Kargman, 1995; Pestili de Almeida, 2001). MF241 is an anti-COX-1 polyclonal antibody that was raised in rabbits against ovine COX-1.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissues were cut in 3 μm sections and placed on Superfrost/Plus (Fisher Scientific) slides. Tissue sections were deparaffinized through graded alcohol series and incubated in 0.3% hydrogen peroxide (Fisher Scientific) in methanol for 30 minutes to block endogenous peroxidase. Slides were rinsed in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Invitrogen) and incubated at room temperature with a solution of goat normal serum from the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories Canada Inc, Burlington, Ontario, Canada) for 20 minutes. They were then incubated overnight at 4°C with either MF243 (1:7500) or MF241 (1:4000). Slides were rinsed in PBS and incubated at room temperature with an anti-rabbit IgG biotinylated secondary antibody from the Vectastain ABC kit for 45 minutes. They were then rinsed in PBS and incubated at room temperature with a solution of reagent A and B complex from Vectastain ABC kit for 45 minutes. Finally, they were rinsed in PBS and exposed to a solution of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-

Aldrich) for 15 minutes. Slides were finally rinsed with water for 5 minutes, and counterstained with hematoxylin (Sigma-Aldrich).

Western blot analysis

Frozen tissues were individually ground up, placed in a Tris-EDTA homogenization solution containing diethyldithiocarbamic acid (DEDTC) (Sigma-Aldrich), Tween 20 (Sigma-Aldrich) and a Complete Mini protease inhibitor cocktail tablet (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada), and centrifuged at 30 000 X g for one hour at 4°C. The crude pellets were sonicated (9 seconds/cycle, 2 cycles) in a Tris-EDTA sonication solution containing DEDTC, Tween 20 and a protease inhibitor cocktail tablet. The sonicates were centrifuged for 15 minutes at 4°C and the supernatant was used for protein dosage by Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada). Proteins (200 µg) were resolved by one-dimensional SDS-PAGE and electrophoretically transferred to Hybond-P polyvinylidene difluoride 0.45µm membrane (GE Healthcare Bio-Sciences Inc. formerly Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada). The membrane was incubated overnight at 4°C with 1:6000 MF243 in nonfat dry 2% milk. The membrane was rinsed with a Tris-buffered saline (TBS) (Fisher Scientific) solution including Tween 20 and incubated for 2 hours at room temperature with 1:12000 ECL horseradish peroxidase labeled anti-rabbit IgG secondary antibody from donkey (GE Healthcare). Finally, the membrane was washed with the TBS solution. The reaction was detected using ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) and revealed on Kodak BioMax X-ray film (Fisher Scientific).

Statistical analyses

All mice which satisfied the study criteria were included in statistical analyses (piroxicam treatment group, n=13; piroxicam control group, n=13; deracoxib treatment group, n=15; deracoxib control group, n=15). The effect of treatment was evaluated by comparing tumor volumes between treated mice (piroxicam or deracoxib) and control mice (vehicle control) at seven selected time points from Day 0 to Day 24 after the start of the treatment. Moreover, tumor volumes were compared between the two treatment groups (piroxicam and deracoxib). For these analyses, tumor volume values were normalized using the base 10 logarithm. Statistical analyses were performed using a repeated measures linear model (repeated measures ANOVA), with time as the within-subject factor and group as the between-subject factor. Post-hoc contrasts were used to examine differences between treatment means at different time points. The sequential Bonferroni correction was used to adjust the α level for particular contrasts, with a family-wise level assigned at 0.05. The software used for these analyses was SAS v.9.1 (Cary, NC, USA).

Results

CMT-9 xenografts in nude mice

CMT-9 cells were injected in the mammary fat pad and xenografts took on average 24 days to reach a volume of 100 mm³ with a success rate of 97%. In fact, tumors did not develop in only two out of 60 mice. Histopathological examination revealed that the tumors exhibited many features of malignancy such as abnormal mitoses, anisocytosis, anisokaryosis, giant nucleoli and multiple nucleoli (Figure 1a). Neoplastic cells formed glandular acini typical of adenocarcinomas. In some tumors, there was a very light infiltration of inflammatory cells (mostly lymphocytes and plasma cells) at the periphery of the mass and, in many tumors, there were central areas of necrosis in the lobules. Distant metastases were found in 14% (8/58) of mice, and these mice were equally distributed in the four treatment groups (2 in the deracoxib group, 2 in the piroxicam group and 2 in each control group). Because the two piroxicam-treated mice had metastases in two organs, a total of ten metastases were present (7/58 in the axillary lymph nodes; 2/58 in the lungs; 1/58 in the kidney) (Figure 1b and 1c). No evidence of ulceration of the gastrointestinal tract was found in either control or treated mice.

COX expression in CMT-9 xenografts

The expression of COX-2 in tumoral tissues was determined by western blot and by immunohistochemical analysis. Western blot analysis of protein extracts from different tumors revealed a moderate to strong signal of the right molecular weight for COX-2 (Figure 2, lanes 2-4). Interestingly, the COX-2 expression of CMT-9 cells

grown *in vitro* was much less intense than in the xenografts (Figure 2, lane 1). Immunohistochemical analysis confirmed the presence of COX-2 expression in the cytoplasm of neoplastic epithelial cells of all xenografts (Figure 3). There was some variability in the intensity of staining between tumors, but most displayed moderate levels of COX-2 immunoreactivity. No difference in the level of COX-2 expression was found between tumors from treated mice and tumors from control mice (data not shown). The expression of COX-1 was also determined by immunohistochemical analysis, and results showed that neoplastic cells in all xenografts expressed low levels of COX-1 (data not shown).

Effect of COX inhibitors on the growth of CMT-9 xenografts

Two COX inhibitors were evaluated: deracoxib, a selective COX-2 inhibitor, and piroxicam, a non selective COX inhibitor. The dose of deracoxib administered to mice (6 mg/kg) was selected using a preliminary study while the dose of piroxicam (0.6 mg/kg) was chosen based on previous literature (Mohammed 2006). No clinical evidence of toxicity was noted with either treatment in any of the mice. Xenografts were measured three times a week and 58 mice developed measurable tumors out of the 60 mice which had surgery (tumor-take rate of 97%). These 58 mice were distributed into four treatment groups; piroxicam treatment group (n=14), piroxicam control group (n=14), deracoxib treatment group (n=15) and deracoxib control group (n=15). However, tumors from two mice grew too fast and these mice were euthanatized (a piroxicam treatment mouse and a piroxicam control mouse). As a result, values of 56 mice were considered for statistical analyses and both piroxicam groups (n=13) had 2 mice less than both deracoxib groups (n=15).

Tumor volumes of the different groups were compared at several points between Day 1 and Day 24 after the beginning of the treatment. Tumor volume averages and standard deviations were calculated for each treatment group at each selected time points (Figure 4 and 5). Analyses revealed no statistically significant difference at all time points studied in the average tumor volume between mice receiving deracoxib and mice receiving the control vehicle (Figure 4). Also, no significant difference in the tumor volume was present between the deracoxib-treated group and the piroxicam-treated group, but a marginal difference was observed between these two groups at Days 21-22 ($p=0.03$). However, for the piroxicam-treated mice, although the difference was not statistically significant, average tumor volumes were lower for the piroxicam-treated animals compared to the control group at all time-points (Figure 5). In particular, a 42% and 39% reduction in tumor volume was present at Days 14-15 and Days 21-22, respectively, for the piroxicam-treated mice. In fact, there was a statistical tendency for a piroxicam effect ($p<0.10$) as tumor volumes of the piroxicam-treated mice were lower than those of the piroxicam control group at three successive time points (D14-D15, D16-D17 and D21-D22).

Discussion

The aim of the present study was to use an *in vivo* model of canine mammary cancer to test the potential anti-cancer property of two commonly used NSAIDs in veterinary medicine. Our model used CMT-9, a cell line derived from a bitch with mammary adenocarcinoma that had metastasized to lymph nodes. We chose to inject this cell line in the mouse mammary fat pad instead of subcutaneously based on previous observations that the mouse mammary fat pad creates a better *in vivo* microenvironment to grow human mammary breast cancer cells (Price, 1990). Using two human breast carcinoma cell lines, Price *et al.* found that tumors grew more readily (with a high frequency of metastasis) in the mammary fat pad compared to the subcutis (Price, 1990). By using this injection site, we experienced a high rate of success of tumor development with 97% of injected mice developing tumors, some (14%) with metastasis. These results suggest that the mammary fat pad also represents a good microenvironment for the growth of canine mammary cell lines.

This is the first study looking at the effect of COX inhibitors on canine mammary tumor growth *in vivo*. Epidemiological evidence has shown that aspirin can have a chemopreventive effect against some human cancers, particularly colorectal cancer (Kune, 2007). A comparable chemopreventive effect for breast cancer is less clear, although many studies have found relative risk reductions varying from 16% to 28% (Gierach, 2008; Harris 2003). Experimental studies have also reported a chemoprotective effect of some selective COX-2 inhibitors, namely celecoxib and SC-236, in different animal models of breast cancer (Harris, 2000; Barnes, 2007; Connolly, 2002; Howe, 2002). We chose to evaluate two COX inhibitors, a selective

inhibitor for COX-2 and an inhibitor of both COX-1 and COX-2. Deracoxib is a selective COX-2 inhibitor used for osteoarthritis management while piroxicam is a non-specific COX inhibitor also used in veterinary medicine. Our results revealed that deracoxib at a dose of 6 mg/kg had no effect on the growth of CMT-9 canine mammary tumor xenografts in nude mice. Progression of tumors in deracoxib-treated mice and in control mice was similar with no significant difference at all the time-points measured. These results suggest that deracoxib does not appear to be an anti-inflammatory agent that could be used to reduce the growth of canine mammary cancers. However, the lack of effect of deracoxib in slowing tumor growth can probably not be generalized to all selective COX-2 inhibitors as a recent study showed marked differences in the anti-proliferative potency and anti-tumorigenic effect between celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib with colon cancer cells (Schiffmann, 2008). In this particular study, only celecoxib and its close structural analogue methylcelecoxib decreased *in vitro* cell survival and reduced *in vivo* tumor growth in nude mice (Schiffmann, 2008).

Piroxicam, a non-selective NSAID, is being used in veterinary medicine to treat some cancers in dogs such as transitional cell carcinoma of the urinary bladder, oral squamous cell carcinoma and prostatic carcinoma (Mohammed, 2002; Schmidt, 2001; Sorenmo, 2004). Only one clinical trial looked at the effect of piroxicam on canine mammary cancer and revealed that a bitch (out of three patients) affected with mammary adenocarcinoma experienced a partial remission with piroxicam treatment (Knapp, 1992). *In vitro*, piroxicam was also shown to inhibit cell proliferation of a canine mammary carcinoma cell line (Knottenbelt, 2006). Results of the present study showed that, although there was no statistically significant difference in the

mean tumor volumes between the piroxicam treatment group and the control group, a 42% and 39% reduction in tumor volumes was observed after 2 and 3 weeks of daily treatment, respectively. Moreover, piroxicam-treated mice had smaller tumors at each selected time point and there was a statistical tendency for the piroxicam treatment group to be different from the control group from Days 14-15 to Days 21-22 ($p < 0.10$). In addition, there was a marginal difference between piroxicam-treated mice and deracoxib-treated mice at Days 21-22 ($p = 0.03$) assessing a greater potential for an anticancer role for piroxicam than for deracoxib. These results suggest a potential therapeutic benefit to the use of piroxicam for canine mammary cancers. A higher dose of piroxicam could potentially yield statistically significant differences. Indeed, we used a dose of 0.6 mg/kg piroxicam in mice, which represents twice the recommended dose for dogs (0.3 mg/kg). Considering that the drug metabolism of mice is higher than in dogs, we might need a slightly higher dose (0.9 mg/kg) to achieve significant differences. Future studies will be performed to evaluate this higher dose of piroxicam.

Piroxicam activity is directed against both COX-1 and COX-2 (Streppa, 2002; Kam, 2000; Cryer, 1998). Considering this dual activity and the lack of effect of deracoxib, the potential anti-tumor effect of piroxicam observed in this study could involve COX-1-dependent mechanisms and/or non-COX mechanisms. This also suggests that the COX-2 status of a tumor may not be a critical element to consider when choosing a NSAID for the treatment of canine mammary cancer. Similarly, Mutsaers *et al.* found that COX-2 expression or PGE₂ concentration were not predictive of the response to piroxicam treatment in dogs with transitional cell carcinomas of the urinary bladder (Mutsaers, 2005). It has also been reported that

piroxicam had some antiproliferative and pro-apoptotic effect on a canine cell line that did not express COX (Knottenbelt, 2006). Although COX-2 is the isoform most often associated with cancer cells, some experimental evidence points toward a role for COX-1 in some human cancers such as skin and ovarian cancer (Tiano, 2002; Gupta, 2003; Daikoku, 2005). As all CMT-9 xenografts expressed low levels of COX-1, it is possible that some of the effect of piroxicam was due to COX-1 inhibition. However, a potential contribution of COX-2 inhibition to the piroxicam effect cannot be completely discarded since, as stated previously, we cannot exclude the possibility that other selective COX-2 inhibitors could have a different anti-tumor effect compared to deracoxib.

Some cancers are caused by chronic inflammation, such as some colorectal carcinomas which result from chronic ulcerative colitis, and some NSAIDs can have anticancer effects due to their anti-inflammatory properties (Coussens, 2002). However, canine mammary adenocarcinomas are not associated with chronic inflammation and no inflammation was detected by histopathological analysis of CMT-9 xenografts. Therefore, we cannot attribute the potential anticancer effect of piroxicam to its anti-inflammatory properties. Moreover, it has been demonstrated that the anticancer effect of some NSAIDs is related to other pathways than their effect on the cyclooxygenase enzymes or their anti-inflammatory properties (Li, 2001; Kundu, 2002). Effectively, it was shown that some NSAIDs (sulindac, sulindac sulfide and celecoxib) block cell cycle progression (Goldberg, 1996; Grösch, 2006). In addition, it was found that some NSAIDs (celecoxib and NS-398, a COX-2 selective NSAID) induce cancer cell apoptosis (Grösch, 2006; Li, 2001). As a result, the potential anticancer effect of piroxicam on canine mammary cancer cells could be

attributed to an inhibition of COX-1 and COX-2 enzymes and/or to COX-independent unknown mechanisms. More studies are needed to clarify the question.

We chose, on the basis of veterinary clinical reality, to begin treatment of each mouse after the appearance of a palpable tumor. Obviously, a bitch affected with mammary cancer would be placed on NSAIDs therapy after the owner would have noticed the mammary tumor. Due to gastro-intestinal side effects and a narrow therapeutic window, it is unlikely that bitches could be placed on a preventive piroxicam therapy, except maybe animals particularly predisposed (old bitch not ovariectomized or who had previous mammary tumors removed). On the other hand, many epidemiological studies showed a chemoprotective effect of some NSAIDs against some human cancers (Chan, 2005). It could therefore be interesting to evaluate the potential anticancer effect of piroxicam in a preventive approach for canine mammary cancer in our murine model at least to address particular cases of predisposed bitches.

The expression of COX-2 by the CMT-9 cell line cultured *in vitro* was much lower than in the xenografts. This *in vivo* induction of COX-2 expression is interesting, although the exact mechanism for this phenomenon is currently unknown. We can hypothesize that mammary cancer cells placed in mammary tissues are surrounded by appropriate cytokines, growth factors, transcription factors, hormones and other key proteins that permit optimal expression pattern. A similar and still unexplained observation was recently made with a human breast cancer cell line (Matsumoto, 2004). MCF-7, a human breast cancer cell line, was also reported to be COX-2 negative *in vitro* while MCF-7 xenografts in immunodeficient mice expressed COX-2 (Matsumoto, 2004).

In conclusion, we have shown that the canine neoplastic mammary cell line CMT-9 grows readily in the mouse mammary fat pad. We have also demonstrated that deracoxib treatment of mice bearing CMT-9 xenografts had no effect on tumor growth. However, these results cannot be extrapolated to other selective COX-2 inhibitors, and evaluation of other available veterinary selective COX-2 inhibitors (such as firocoxib) could yield different results. Finally, we have presented evidence that piroxicam treatment (0.6 mg/kg daily) appeared to influence tumor volume after 2 and 3 weeks although not at a statistically significant level. Future planned studies will be needed to confirm that piroxicam constitutes a potential therapeutic agent against mammary cancers.

Acknowledgements

We thank Dre Jilly F. Evans and Dre Stacia Kargman (Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Pointe-Claire, Québec, Canada) for generously providing COX antibodies and Novartis Animal Health Canada (Mississauga, Ontario, Canada) for the generous gift of deracoxib. We also thank Ms. Danielle Rannou (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal) and Ms. Mélanie Michaud (Animalerie Jean et Marcelle Coutu, Université de Montréal) for technical assistance. This work was supported by a fellowship (KSD) and a grant (MD) from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada .

References

- Barnes NL, Warnberg F, Farnie G, White D, Jiang W, Anderson E, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition: effects on tumour growth, cell cycling and lymphangiogenesis in a xenograft model of breast cancer. *British Journal of Cancer* 2007; **96**: 575-82.
- Boland GP, Butt IS, Prasad R, Knox WF and Bundred NJ. COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *British Journal of Cancer* 2004; **90**: 423-9.
- Boldizsár H, Muray T, Szamel I, Szenci O and Csenki J. Studies on canine mammary tumours. II. Oestradiol and progesterone receptor binding capacity and histological type. *Acta Veterinaria Hungarica* 1992; **40**: 89-97.
- Brunelle M, Sartin EA, Wolfe LG, Sirois J and Dore M. Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Veterinary Pathology* 2006; **43**: 656-66.
- Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC and Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 2005; **294**: 914-23.
- Connolly EM, Harmey JH, O'Grady T, Foley D, Roche-Nagle G, Kay E, et al. Cyclooxygenase inhibition reduces tumour growth and metastasis in an orthotopic model of breast cancer. *British Journal of Cancer* 2002; **87**: 231-7.
- Coussens LM and Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420**: 860-7.

- Cryer B and Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American Journal of Medicine* 1998; **104**: 413-21.
- Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN, et al. Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Research* 2005; **65**: 3735-44.
- Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M, et al. Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2003; **97**: 2978-87.
- Doré M, Lanthier I and Sirois J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 2003; **40**: 207-12.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S and DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; **107**: 1183-8.
- Fitzpatrick FA and Soberman R. Regulated formation of eicosanoids. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; **107**: 1347-51.
- García Rodríguez LA and Gonzalez-Perez A. Risk of breast cancer among users of aspirin and other anti-inflammatory drugs. *British Journal of Cancer* 2004; **91**: 525-9.
- Gierach GL, Lacey JV, Jr., Schatzkin A, Leitzmann MF, Richesson D, Hollenbeck AR, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Breast Cancer Research : BCR* 2008; **10**: R38.

- Goldberg Y, Nassif, II, Pittas A, Tsai LL, Dynlacht BD, Rigas B, et al. The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins. *Oncogene* 1996; **12**: 893-901.
- Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S and Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2) independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; **98**: 736-47.
- Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, et al. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Research* 2003; **63**: 906-11.
- Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K and Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Research* 2002; **62**: 1676-81.
- Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H and Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Research* 2000; **60**: 2101-3.
- Harris RE, Chlebowski RT, Jackson RD, Frid DJ, Ascenseo JL, Anderson G, et al. Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative. *Cancer Research* 2003; **63**: 6096-101.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM and Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2001; **8**: 97-114.

- Howe LR, Subbaramaiah K, Patel J, Masferrer JL, Deora A, Hudis C, et al. Celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, protects against human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)/neu-induced breast cancer. *Cancer Research* 2002; **62**: 5405-7.
- Howe LR and Dannenberg AJ. COX-2 inhibitors for the prevention of breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2003; **8**: 31-43.
- Jacobs EJ, Thun MJ, Connell CJ, Rodriguez C, Henley SJ, Feigelson HS, et al. Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer incidence in a large U.S. cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2005; **14**: 261-4.
- Johnson TW, Anderson KE, Lazovich D and Folsom AR. Association of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use with breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2002; **11**: 1586-91.
- Kam PC and See AU. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia* 2000; **55**: 442-9.
- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA and Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Research* 1995; **55**: 2556-9.
- Khan KN, Knapp DW, Denicola DB and Harris RK. Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 2000; **61**: 478-81.
- Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D and Knapp DW. Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Veterinary Pathology* 2001; **38**: 116-9.

- Knapp DW, Richardson RC, Bottoms GD, Teclaw R and Chan TC. Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1992; **29**: 214-8.
- Knottenbelt C, Chambers G, Gault E and Argyle DJ. The in vitro effects of piroxicam and meloxicam on canine cell lines. *The Journal of Small Animal Practice* 2006; **47**: 14-20.
- Kundu N and Fulton AM. Selective cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer. *Cancer Research* 2002; **62**: 2343-6.
- Kune GA, Kune S and Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. 1988. *International Journal of Epidemiology* 2007; **36**: 951-7.
- Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY and Kweon OK. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science* 2004; **5**: 63-9.
- Levy GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *The FASEB Journal* 1997; **11**: 234-47.
- Li M, Wu X and Xu XC. Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. *Clinical Cancer Research* 2001; **7**: 1010-6.
- Matsumoto G, Rahman MA, Muta M, Nakamura T, Bando H, Saji S, et al. DFU, a selective COX-2 inhibitor, suppresses MCF-7 xenograft tumor growth in mice. *Oncology Reports* 2004; **12**: 281-5.

- Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, et al. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; **22**: 976-84.
- Millanta F, Citi S, Della Santa D, Porciani M and Poli A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment* 2006; **98**: 115-20.
- Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S and Hayaishi O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 1976; **251**: 2629-36.
- Mohammed SI, Bennett PF, Craig BA, Glickman NW, Mutsaers AJ, Snyder PW, et al. Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Research* 2002; **62**: 356-8.
- Mohammed SI, Dhawan D, Abraham S, Snyder PW, Waters DJ, Craig BA, et al. Cyclooxygenase inhibitors in urinary bladder cancer: in vitro and in vivo effects. *Molecular Cancer Therapeutics* 2006; **5**: 329-36.
- Muto T, Wakui S, Takahashi H, Maekawa S, Masaoka T, Ushigome S, et al. p53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology* 2000; **37**: 248-53.

- Mutsaers AJ, Mohammed SI, DeNicola DB, Snyder PW, Glickman NW, Bennett PF, et al. Pretreatment tumor prostaglandin E2 concentration and cyclooxygenase-2 expression are not associated with the response of canine naturally occurring invasive urinary bladder cancer to cyclooxygenase inhibitor therapy. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 2005; **72**: 181-6.
- Pestili de Almeida EM, Piche C, Sirois J and Dore M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2001; **49**: 867-75.
- Price JE, Polyzos A, Zhang RD and Daniels LM. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Research* 1990; **50**: 717-21.
- Queiroga FL, Alves A, Pires I and Lopes C. Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 2007; **136**: 177-85.
- Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Research* 1995; **55**: 3785-9.
- Schiffmann S, Maier TJ, Wobst I, Janssen A, Corban-Wilhelm H, Angioni C, et al. The anti-proliferative potency of celecoxib is not a class effect of coxibs. *Biochemical Pharmacology* 2008; **76**: 179-87.
- Schmidt BR, Glickman NW, DeNicola DB, de Gortari AE and Knapp DW. Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001; **218**: 1783-6.

- Schneider R, Dorn CR and Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute* 1969; **43**: 1249-61.
- Schreinemachers DM and Everson RB. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology* 1994; **5**: 138-46.
- Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Research* 2002; **62**: 506-11.
- Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 1999; **282**: 1254-7.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD and DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Research* 1998; **58**: 362-6.
- Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y and Erikson RL. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; **86**: 1178-82.
- Sorenmo KU, Goldschmidt MH, Shofer FS, Goldkamp C and Ferracone J. Evaluation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression and the effect of cyclooxygenase inhibitors in canine prostatic carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 2004; **2**: 13-23.

Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, et al.

COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000; **89**: 2637-45.

Streppa HK, Jones CJ and Budsberg SC. Cyclooxygenase selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in canine blood. *American Journal of Veterinary Research* 2002; **63**: 91-4.

Terry MB, Gammon MD, Zhang FF, Tawfik H, Teitelbaum SL, Britton JA, et al. Association of frequency and duration of aspirin use and hormone receptor status with breast cancer risk. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 2004; **291**: 2433-40.

Thun MJ, Namboodiri MM and Heath CW, Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *The New England Journal of Medicine* 1991; **325**: 1593-6.

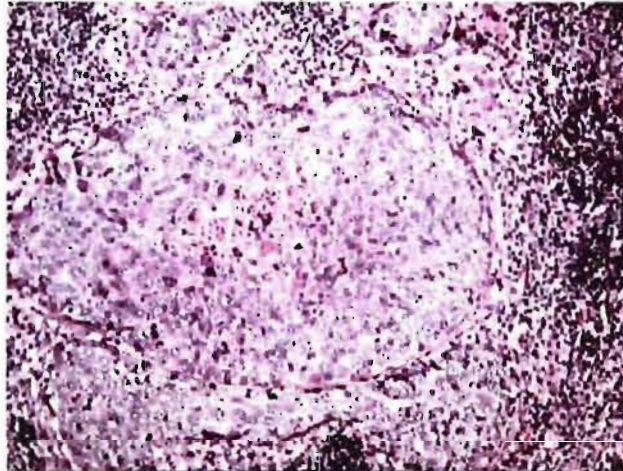
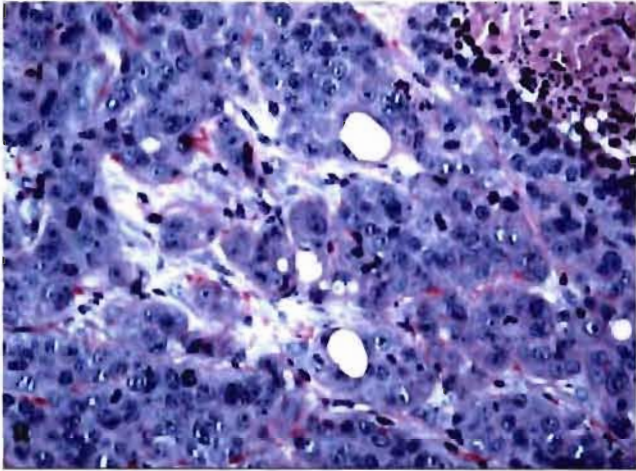
Tiano HF, Loftin CD, Akunda J, Lee CA, Spalding J, Sessoms A, et al. Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Research* 2002; **62**: 3395-401.

Tsuji M, Kawano S and DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; **94**: 3336-40.

Vane JR, Bakhle YS and Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1998; **38**: 97-120.

Wolfe LG, Smith BB, Toivio-Kinnucan MA, Sartin EA, Kwapien RP, Henderson RA, et al. Biologic properties of cell lines derived from canine mammary carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 1986; **77**: 783-92.

Figure 1. CMT9 xenografts and metastases in nude mice. **a.** CMT-9 cell line was injected in the left cranial mammary fat pad of nude mice. CMT-9 xenografts showed many malignant criteria such as abnormal mitoses and anisocytosis as well as central necrosis. Glandular acini typical of adenocarcinomas were present. Some CMT-9 xenografts produced distant metastases. **b and c.** Metastases to an axillary lymph node (**b**) and to the lung (**c**) are shown. Metastases were composed of malignant cells histopathologically similar to CMT-9 xenograft cells. HEPS stain.



c

Figure 1

Figure 2. COX-2 expression in CMT-9 cell line and in CMT-9 xenografts in nude mice. Proteins (200 μg) of the canine mammary tumor cell line (CMT-9) cultured as described in “Materials and Methods” and proteins (200 μg) extracted from CMT-9 xenografts were resolved on a one-dimensional SDS-PAGE, electrophoretically transferred to a membrane and revealed using a polyclonal anti-COX-2 antibody. COX-2 expression of CMT-9 xenografts in nude mice (lanes 2-4) was stronger than in CMT-9 cells grown *in vitro* (lane 1).

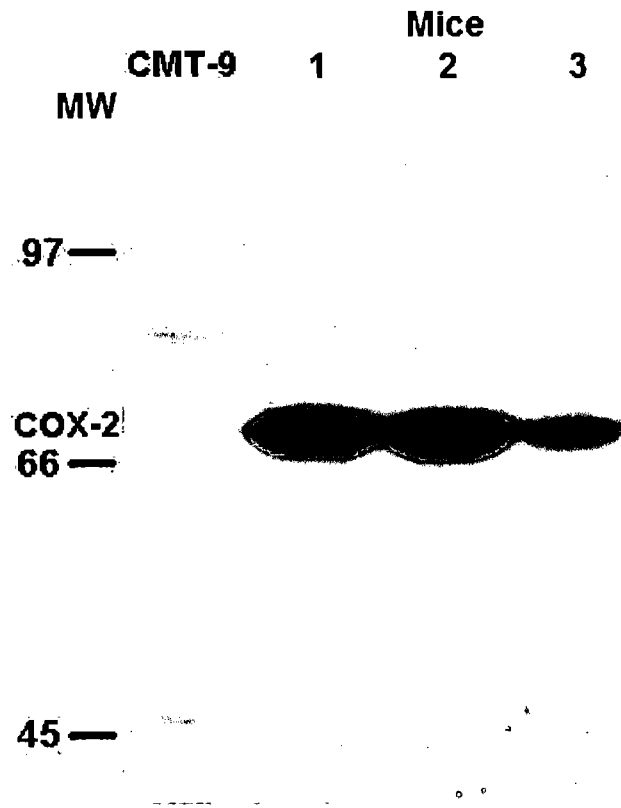


Figure 2

Figure 3. COX-2 expression in CMT9 xenografts. Immunohistochemical analysis of CMT9 xenografts for COX-2 showed a diffuse light to moderate cytoplasmic staining in neoplastic epithelial cells. All CMT-9 xenografts were COX-2 positive. DAB substrate and hematoxylin counterstain.

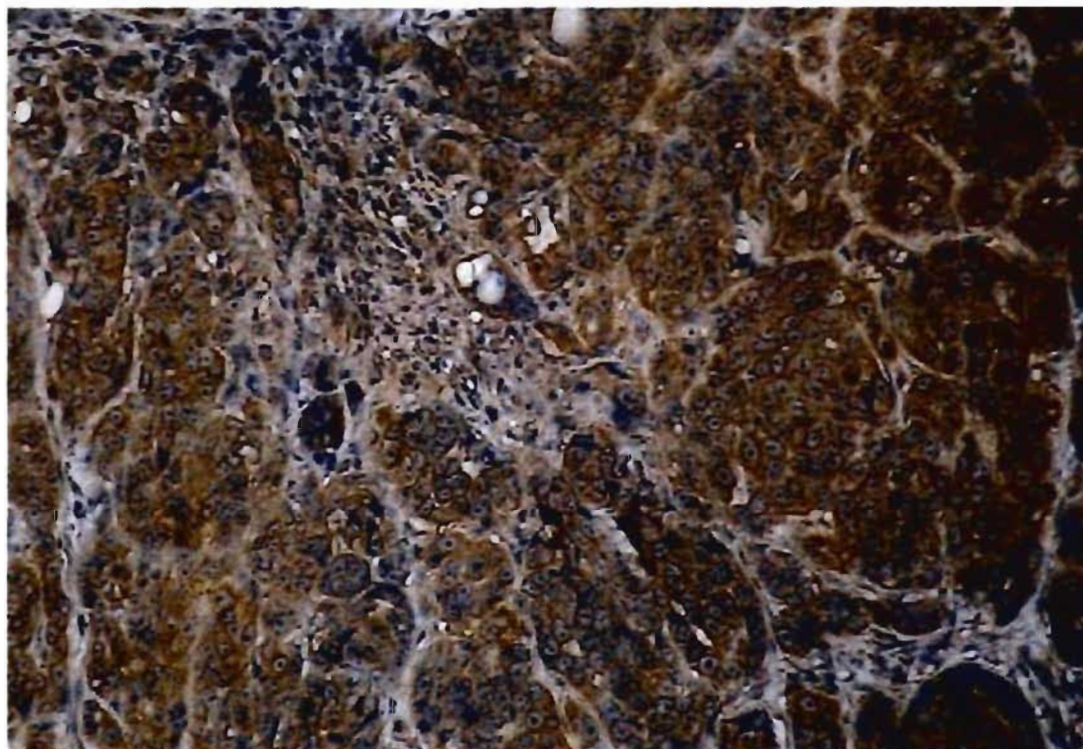


Figure 3

Figure 4. Tumor volume of deracoxib and control groups at different time points. Days represent the number of days under treatment for each mouse. D1 constitutes the first day of treatment of each mouse and the first tumor measure analysed was taken on D1 or D0. Tumor volume was calculated as described in “Materials and Methods”. Due to mortality, the number of animals at each time point varies from 15 to 10 mice. There was no significant difference between deracoxib-treated mice and control mice.

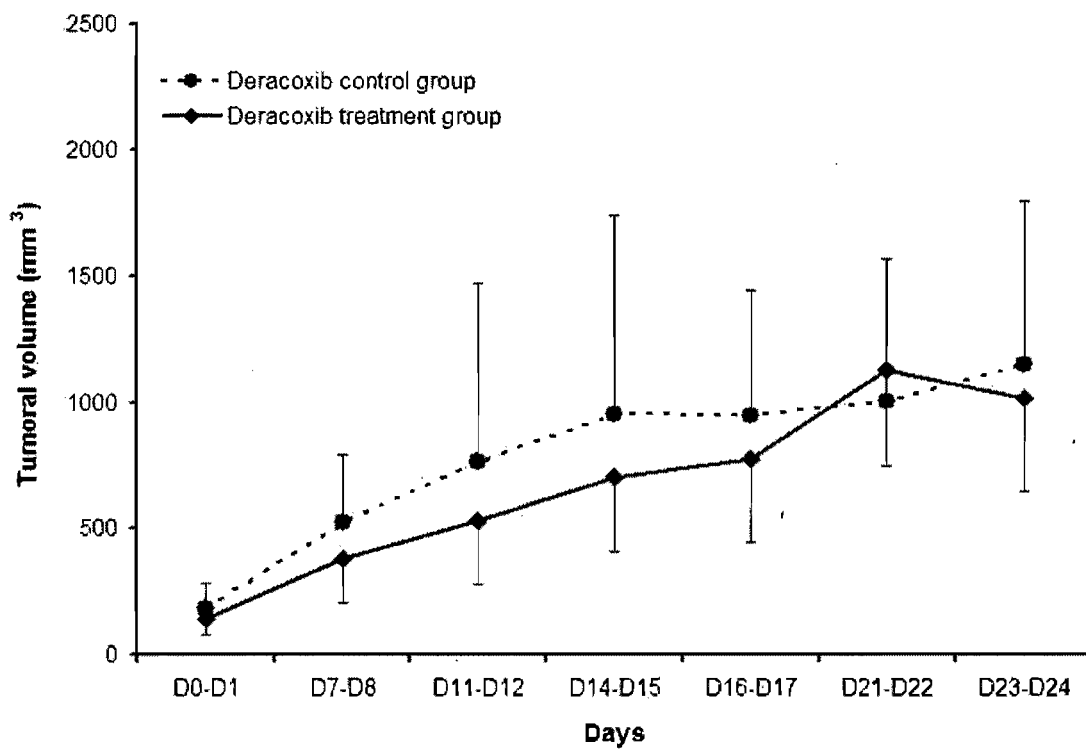


Figure 4

Figure 5. Tumor volume of piroxicam and control groups at different time points. Days represent the number of days under treatment for each mouse. D1 constitutes the first day of treatment of each mouse and the first tumor measure analysed was taken on D1 or D0. Tumor volume was calculated as described in “Materials and Methods”. The number of mice at each time point varies (from 13 to 10) due to mortality. Although there was no statistically significant difference between piroxicam-treated mice and control mice, a reduction in tumor volume was noted at several time-points and these groups tend to be different from D14-D15 to D21-D22 ($p < 0.10$).

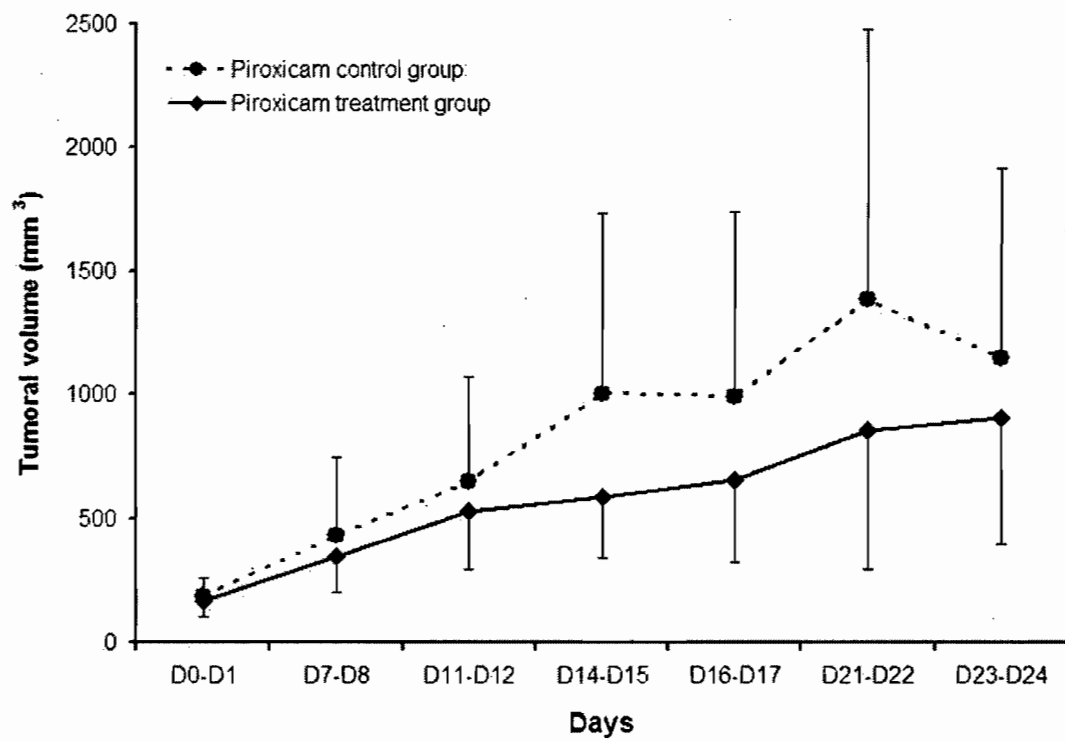


Figure 5

Discussion

La COX-2 et la PGE₂, produite par l'action de la COX-2, ont été impliquées dans la cancérogénèse de nombreux cancers. En médecine vétérinaire, il a été démontré que 56% des adénocarcinomes mammaires canins surexprimaient la COX-2 (Doré, 2003). Puis, il a été décrit qu'une lignée cellulaire dérivant d'une tumeur mammaire canine qui surexprimait la COX-2 *in vitro* produisait des taux significativement plus élevés de PGE₂ que les lignées cellulaires de ce type de tumeur qui n'exprimaient pas la COX-2 *in vitro* (Brunelle, 2006). Finalement, des études testant l'effet des AINS sur les adénocarcinomes mammaires canins ont été conduites et ont révélé que le piroxicam, le méloxicam et le NS-398 (un inhibiteur spécifique de la COX-2) inhibent la prolifération de ces cellules tumorales *in vitro* (Knottenbelt, 2006; Brunelle, 2006). Puisque les tumeurs mammaires constituent le cancer le plus prévalent chez la chienne intacte et que les options thérapeutiques actuelles ne permettent pas de contrôler adéquatement la progression d'une proportion de ces tumeurs malignes, l'intérêt pour de nouvelles approches thérapeutiques est grandissant au sein de la communauté vétérinaire (Merlo, 2008; Withrow, 2007).

Le but de la présente étude était donc de répondre à un questionnement d'intérêt clinique concernant un potentiel effet anticancer du piroxicam et du deracoxib contre l'adénocarcinome mammaire canine. Pour ce faire, un modèle murin a été établi afin de déterminer l'efficacité de ces deux AINS dans le traitement des tumeurs mammaires canines *in vivo*.

Au fil des décennies, plusieurs approches chirurgicales utilisées sur des souris pour l'injection de cellules cancéreuses ont été décrites (Deome, 1959; Daniel, 1968). La technique utilisée lors de la présente étude est dérivée d'une méthode plus récente où l'injection des cellules cancéreuses a lieu dans le coussinet graisseux mammaire d'une glande mammaire thoracique (Price, 1990a). Le coussinet graisseux mammaire murin a été défini comme un endroit de prédilection pour l'injection de cellules tumorales mammaires puisque le microenvironnement de la glande mammaire favoriserait l'angiogénèse tumorale (Miller, 1981; Price, 1990a). Il a d'ailleurs été démontré que l'inoculum essentiel à la formation de tumeurs dans le coussinet graisseux mammaire est inférieur à celui nécessaire lors d'injections sous-cutanées (Miller, 1981; Price, 1990a). Dans une étude pilote effectuée en prévision de la présente étude, l'injection de 5 millions de cellules CMT-9 dans le coussinet graisseux mammaire thoracique de souris nues induisait la formation de tumeurs dont la moyenne des volumes était supérieure à temps fixes à celle des tumeurs résultant de l'injection de 10 millions de cellules CMT-9 sous-cutanée dans le flanc (résultats non présentés). De plus, les tumeurs originant d'injections dans le coussinet graisseux mammaire semblent former plus fréquemment des métastases à distance que les tumeurs dérivant d'injections sous-cutanées (Price, 1990b). Ainsi, lors de la présente étude, le taux de succès de formation de tumeurs suite à l'injection de 5 millions de cellules CMT-9 dans le coussinet graisseux mammaire d'une glande mammaire thoracique gauche était de 97% chez la souris athymique et 8 de ces souris ont été atteintes de métastases (noeuds lymphatiques axillaires, poumons et/ou reins). Le coussinet graisseux mammaire est donc le site d'injection à privilégier pour l'étude des cellules tumorales mammaires canines chez les souris immunosupprimées.

L'apparence histopathologique de ces tumeurs murines étant similaire à celle de la tumeur mammaire métastatique dont la lignée CMT-9 est originaire, ces résultats permettent de conclure à la validité de ce modèle *in vivo* de cancer mammaire canin testé pour la première fois lors de notre étude.

Dans la présente étude, la lignée cellulaire CMT-9 exprimait faiblement la COX-2 *in vitro*. Cependant, les analyses par immunobuvardage de type western ont démontré que la COX-2 était fortement exprimée par les xénogreffes murines originant de l'injection de cellules CMT-9. Cette induction *in vivo* de l'expression de la COX-2 dépend de mécanismes actuellement inconnus. Par contre, des expériences menées sur le cancer du sein chez la femme ont montré que des cellules tumorales injectées dans le coussinet graisseux mammaire de souris immunosupprimées présentaient des profils d'activité enzymatique différents de la lignée cellulaire d'origine (Jessani, 2005). Ces auteurs accordent au microenvironnement du coussinet graisseux mammaire la capacité de sélectionner les populations de cellules les plus malignes (Jessani, 2005). Dans la présente étude, une population de cellules surexprimant la COX-2 pourrait ainsi être sélectionnée. Par ailleurs, la surexpression de la COX-2 a été associée à un phénotype malin pour les tumeurs mammaires canines (Doré, 2003; Millanta, 2006). De plus, une étude de Matsumoto *et al.* a présenté que la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 était négative pour la COX-2 *in vitro*, alors que les xénogreffes des souris originant de la lignée MCF-7 exprimaient la COX-2 (Matsumoto, 2004). Il a été proposé que des facteurs tels le TNF- α ou le NF- κ B pourraient avoir un rôle à jouer dans cette induction *in vivo*

(Matsumoto, 2004). D'autres études seraient nécessaires afin d'élucider ce phénomène d'induction *in vivo* de la COX-2.

Nous avons choisi de traiter les souris nues avec une solution contrôle, du piroxicam (un AINS non-sélectif) ou du deracoxib (un AINS sélectif pour la COX-2) afin d'évaluer l'impact de la sélectivité de l'AINS sur l'inhibition de la croissance tumorale. Le traitement des souris débutait dès que leur tumeur avait atteint un volume de 100 mm³. Or, plusieurs papiers ont décrit le rôle chimioprotecteur de l'aspirine mis en évidence dans des études épidémiologiques prospectives portant sur le cancer colorectal humain (Schreinemachers, 1994; Chan, 2005). En fait, notre choix de traiter les souris lorsque la masse était détectable macroscopiquement est basé sur la réalité clinique à savoir que la chienne atteinte de cancer mammaire sera mise sous traitement uniquement lorsque le propriétaire et le vétérinaire auront noté la présence de la tumeur mammaire. Le piroxicam n'étant pas un AINS couramment utilisé en clinique dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques, telle l'ostéoarthrose (contrairement au deracoxib), et les effets secondaires du piroxicam sur le tractus gastro-intestinal étant à considérer à long terme, il est peu concevable d'envisager de placer des chiennes sous traitement avec le piroxicam en prévention d'un cancer. Par contre, d'autres études sont à considérer afin d'investiguer le potentiel chimioprotecteur du piroxicam contre les tumeurs mammaires canines pour traiter les chiennes les plus à risques; par exemple, les chiennes âgées non ovariohystérectomisées ayant déjà subi une chirurgie d'exérèse de tumeurs mammaires.

Les résultats de notre étude permettent d'affirmer que le deracoxib n'a pas d'effet sur la croissance de tumeurs mammaires canines *in vivo*. En effet, aucune

différence n'a été notée entre le groupe de souris traitées au deracoxib à une dose de 6 mg/kg et le groupe contrôle. Pour ce qui est du traitement avec le piroxicam, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre le groupe traité et le groupe contrôle. Par contre, dans la fenêtre de temps s'étendant entre les Jours 14-15 et les Jours 21-22, une tendance s'installe où la moyenne des volumes des tumeurs des souris traitées est particulièrement inférieure à celle des souris contrôles. D'ailleurs, une réduction de 42% et de 39% de la moyenne des volumes des tumeurs est notée pour le groupe traité en comparaison avec le groupe contrôle à Jours 14-15 et à Jours 21-22 respectivement. En addition, une autre tendance peut être relevée à Jours 21-22 où une différence marginale caractérise le groupe traitement piroxicam en comparaison avec le groupe traitement deracoxib; le groupe traitement piroxicam ayant une moyenne des volumes des tumeurs inférieure à celle du groupe traitement deracoxib. Ainsi, le piroxicam semble avoir un effet anticancer potentiel, même si les résultats de la présente étude ne peuvent formellement statuer en ce sens.

Une étude clinique sur un nombre limité de sujets a démontré une rémission partielle suite au traitement avec le piroxicam pour une chienne sur trois atteintes d'adénocarcinomes mammaires (Knapp, 1992). La dose de piroxicam recommandée chez l'espèce canine est de 0.3 mg/kg une fois par jour per os (Knapp, 1992). Dans notre étude, les souris traitées avec le piroxicam ont reçu une dose de 0.6 mg/kg; le choix de la dose ayant été établi sur la base de publications antérieures (Mohammed, 2006). De plus, la comparaison de la pharmacocinétique du piroxicam chez les rongeurs avec celle chez le chien a permis de valider cette dose (Schiantarelli, 1981; Galbraith, 1991). Assumant que la pharmacocinétique était linéaire chez les espèces comparées, les valeurs de l'aire sous la courbe chez le chien ont été mises en parallèle

avec celles chez le rat. En effet, les valeurs de l'aire sous la courbe ne sont pas disponibles chez la souris, mais la demi-vie du piroxicam chez le rat et chez la souris sont presque identiques. En comparant les valeurs chez le chien et chez le rat, le chien est, à dose égale, deux fois plus exposé au piroxicam que le rat (Schiantarelli, 1981; Galbraith, 1991). Une absorption orale ralentie et un métabolisme plus faible chez le chien comparé au rat pourraient expliquer cette constatation, de même qu'un taux de liaison aux protéines plasmatiques et une recirculation entérohépatique plus élevés chez l'espèce canine. Ainsi, le piroxicam peut avoir plus d'effets thérapeutiques et toxiques chez le chien que chez le rat à dose égale et la dose de piroxicam pour les rongeurs doit être, au minimum, doublée afin de refléter son effet chez l'espèce canine. D'autre part, comme la demi-vie du piroxicam est huit fois plus petite chez la souris (5 heures) que chez le chien (40 heures), en administrant le traitement de piroxicam aux 24 heures, une accumulation de la molécule a lieu chez le chien par opposition à la souris (Schiantarelli, 1981; Galbraith, 1991). Par conséquent, même avec une dose de 0.6 mg/kg de piroxicam chez la souris, il est possible que la concentration plasmatique ait été inférieure à la concentration à l'équilibre suite à des doses répétées de 0.3 mg/kg chez le chien. Or, une étude sera conduite prochainement en utilisant le même modèle animal, mais en traitant les souris avec une dose de piroxicam de 0.9 mg/kg afin de déterminer l'impact de cette dose sur l'effet anticancer potentiel du piroxicam envers les cellules de tumeurs mammaires canines.

Tel que mentionné précédemment, une chienne sur trois cas de cancer mammaire avait bénéficié d'une rémission partielle suite au traitement avec le piroxicam lors d'une étude clinique (Knapp, 1992). Il est donc à considérer que l'effet anticancer potentiel du piroxicam sur ce cancer puisse ne s'appliquer qu'à

certaines individus dans une population sur la base de mécanismes encore inconnus, possiblement l'expression de la COX-2 par la tumeur. Il s'ensuit que la taille de l'échantillon de l'expérimentation doit être assez grande afin de mettre en relief de manière statistiquement significative cet effet rare. En ce sens, il serait judicieux d'effectuer d'autres études à partir du même modèle animal afin d'évaluer l'impact d'un plus grand nombre de souris traitées avec le piroxicam sur la valeur statistique de cet effet anticancer potentiel.

De plus, le modèle *in vivo* établi dans la présente étude présente une variation importante entre les individus en ce qui concerne la croissance des xénogreffes de tumeurs mammaires canines. Malgré son impact négatif sur le pouvoir statistique, cette variation accorde à ce modèle murin l'avantage d'être représentatif de la réalité clinique puisque le comportement biologique des tumeurs mammaires canines est grandement variable d'une chienne à l'autre. D'ailleurs, la tumeur d'une souris contrôle piroxicam et celle d'une souris traitement piroxicam ont eu une croissance trop rapide, par conséquent, ces deux souris ont été retirées de l'analyse statistique. Donc, les groupes contrôle et traitement piroxicam (n=13) comprenaient chacun deux souris de moins lors de l'analyse statistique que les groupes contrôle et traitement deracoxib (n=15).

L'analyse immunohistochimique des xénogreffes a révélé, quant à elle, que l'expression de la COX-2 était légèrement variable d'un échantillon à l'autre. Les différents traitements ne semblaient pas avoir d'influence sur l'expression de la COX-2. Cependant, il convient de se questionner à savoir si le piroxicam aura eu un effet variable sur la progression tumorale selon l'expression de la COX-2 par les xénogreffes. Certains auteurs ont décrit que les tumeurs qui expriment peu la COX-2

pourraient moins bien répondre au traitement avec un AINS (Toyota, 2000). Des phénomènes épigénétiques qui entraînent ultimement une diminution de l'expression de la COX-2 ont été rapportés pour certains cas de cancer colorectal humain (Toyota, 2000). Nos résultats ne permettent pas d'énoncer de conclusions sur la question, mais il serait intéressant d'effectuer d'autres études afin de déterminer si l'expression de la COX-2 par les xénogreffes de tumeurs mammaires canines permet de prédire leur réponse au traitement avec le piroxicam.

En addition, il est possible d'envisager que le piroxicam ait eu un certain effet inhibiteur sur la progression tumorale des xénogreffes de tumeurs mammaires canines indépendamment de son effet sur la COX-2. Effectivement, outre la COX-2, la COX-1 pourrait aussi avoir un rôle à jouer dans la cancérogénèse de certains cancers (Tiano, 2002). En ce qui concerne le cancer de l'ovaire, il a été rapporté que la COX-1 serait surexprimée (contrairement à la COX-2) et que la COX-1 favoriserait la néovascularisation tumorale par la production de VEGF (Gupta, 2003). Ces auteurs affirment d'ailleurs qu'un inhibiteur de la COX non-sélectif leur semblerait plus prometteur dans le traitement de ce cancer qu'un inhibiteur sélectif pour la COX-2 (Gupta, 2003; Daikoku, 2005). En médecine vétérinaire, la COX-2 est reconnue pour être l'isoforme impliquée dans la cancérogénèse des tumeurs mammaires canines (Doré, 2003). Néanmoins, nos analyses immunohistochimiques ont révélé que les xénogreffes murines étaient faiblement positives pour la COX-1 (résultats non présentés). Comme mentionné précédemment, le piroxicam est un AINS qui, contrairement au deracoxib, inhibe la COX-1 et la COX-2 (Streppa, 2002; Kam, 2000; Cryer, 1998). Ainsi, l'effet du piroxicam sur la croissance tumorale des xénogreffes murines pourrait être lié à son action sur la COX-1, ce qui expliquerait,

par le fait même, l'inefficacité du deracoxib. De plus, de nombreux articles ont rapporté que les AINS pouvaient avoir un effet anticancer indépendant de leur action sur la COX (Kardosh, 2005; Goldberg, 1996; Kundu, 2002). Par exemple, le celecoxib, un AINS sélectif pour la COX-2, peut mener directement à un arrêt de la progression dans le cycle cellulaire (en inhibant la protéine kinase B ou la kinase phosphoinositide-dépendent kinase 1) ou à l'induction de l'apoptose (en induisant une diminution des protéines antiapoptotiques et une augmentation des protéines proapoptotiques) (Grösch, 2006). Par conséquent, il est possible que, dans notre étude, le piroxicam ait eu un effet inhibiteur sur la progression tumorale des xénogreffes murines indépendant de son action sur les isoformes de la COX. Toutefois, nos connaissances actuelles de l'effet du piroxicam sur les cellules d'adénocarcinomes mammaires canins ne nous permettent pas de trancher sur le sujet.

En résumé, cette étude est la première à évaluer l'effet d'inhibiteurs de la COX sur la progression de tumeurs mammaires canines dans un modèle murin. Les résultats de cette étude ont démontré que le deracoxib, un AINS sélectif pour la COX-2, n'a pas d'effet anticancer contre les tumeurs mammaires canines *in vivo* et il ne devrait donc pas être recommandé pour le traitement de ce cancer chez la chienne. Par opposition, il semblerait y avoir une tendance selon laquelle le piroxicam, un AINS non-sélectif, inhiberait la croissance des xénogreffes murines de tumeurs mammaires canines suite à un minimum de deux semaines de traitement. Ainsi, d'autres études seront nécessaires afin d'élucider l'effet anticancer potentiel du piroxicam contre les tumeurs mammaires canines.

Conclusion

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité de deux inhibiteurs de la cyclooxygénase, le piroxicam (un AINS non-sélectif) et le deracoxib (un AINS sélectif pour la COX-2), dans le traitement de tumeurs mammaires canines dans un modèle murin. Une lignée cellulaire (CMT-9) provenant d'un adénocarcinome mammaire métastatique canin a été utilisée pour induire des xénogreffes dans le coussinet graisseux mammaire de souris nues. Cette étude a d'abord permis de valider le modèle expérimental utilisé qui possède un taux de formation de tumeurs de 97% et un taux de formation de métastases de 17%. Le coussinet graisseux mammaire murin constitue donc un site d'injection de prédilection pour les cellules de tumeurs mammaires canines. Par la suite, les souris ont été traitées avec une solution contrôle, du piroxicam ou du deracoxib. Aucune différence n'a été notée entre le groupe traitement deracoxib et son groupe contrôle. Ainsi, le deracoxib n'a pas d'effet sur la progression tumorale des xénogreffes de tumeurs mammaires canines. Au contraire, le piroxicam semble avoir un certain effet inhibiteur, bien que statistiquement non significatif, sur la croissance de ces tumeurs *in vivo*. En effet, la moyenne des volumes des tumeurs des souris traitées avec le piroxicam était inférieure à celle des souris du groupe contrôle de 42% et 39% aux Jours 14-15 et Jours 21-22 respectivement. Les analyses immunohistochimiques et par immunobuvardage de type western ont, quant à elles, confirmé la surexpression de la COX-2 par les cellules tumorales des xénogreffes murines. Par conséquent, de ces deux AINS testés, seul le piroxicam peut être potentiellement recommandé en

clinique actuellement dans le protocole thérapeutique des chiennes atteintes de cancer mammaire.

Une nouvelle étude sera conduite prochainement afin de tester, dans ce modèle murin de cancer mammaire canin, le potentiel effet anticancer du piroxicam à une dose plus élevée (0.9 mg/kg). Cette expérimentation permettra de préciser l'efficacité du traitement avec le piroxicam contre les tumeurs mammaires canines. Des études de pharmacocinétique seraient aussi importantes afin de pouvoir mieux identifier la dose de piroxicam chez la souris qui serait susceptible de correspondre à la dose qui peut être prescrite chez le chien (0.3 mg/kg) pour s'assurer de pouvoir adéquatement extrapoler les conclusions identifiées dans un modèle murin. De plus, étant donné l'effet chimioprotecteur de l'aspirine contre certains cancers humains, il serait intéressant d'envisager des études dans un modèle murin ainsi que des études cliniques afin de déterminer l'utilité du traitement avec le piroxicam dans la prévention des tumeurs mammaires canines pour les chiennes les plus à risques. Les chiennes âgées intactes ou les chiennes déjà atteintes de cancer mammaire pourraient ainsi potentiellement bénéficier d'une thérapie préventive. Puis, des études évaluant l'effet de d'autres inhibiteurs sélectifs pour la COX-2, tel que le firocoxib, dans le traitement des tumeurs mammaires canines permettraient de préciser le rôle de la COX-2 dans la cancérogénèse de ces néoplasmes. Enfin, une seule étude clinique a rapporté l'efficacité du piroxicam dans le traitement de trois chiennes atteintes de cancer mammaire. Ainsi, des études cliniques avec des chiennes atteintes de tumeurs mammaires à différents stades de malignité pourraient apporter beaucoup d'informations; par exemple, il serait digne d'intérêt de mettre en relation le niveau d'expression de la COX-1 et de la COX-2 par la tumeur avec la réponse au traitement

avec un AINS tel le piroxicam. Ces études auraient l'avantage d'être directement liées à la réalité clinique expérimentée par les vétérinaires praticiens dans le secteur des animaux de compagnie.

Bibliographie

- Ahern TE, Bird RC, Bird AE and Wolfe LG. Expression of the oncogene *c-erbB-2* in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *American journal of veterinary research* 1996; **57**: 693-6.
- Asano T, Shoda J, Ueda T, Kawamoto T, Todoroki T, Shimonishi M, et al. Expressions of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E-receptors in carcinoma of the gallbladder: crucial role of arachidonate metabolism in tumor growth and progression. *Clinical Cancer Research* 2002; **8**: 1157-67.
- Balciunaite G, Keller MP, Balciunaite E, Piali L, Zuklys S, Mathieu YD, et al. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nature Immunology* 2002; **3**: 1102-8.
- Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer* 2004; **4**: 540-50.
- Barnes NL, Warnberg F, Farnie G, White D, Jiang W, Anderson E, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition: effects on tumour growth, cell cycling and lymphangiogenesis in a xenograft model of breast cancer. *British Journal of Cancer* 2007; **96**: 575-82.
- Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *The New England Journal of Medicine* 2003; **348**: 891-9.

- Boland GP, Butt IS, Prasad R, Knox WF and Bundred NJ. COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *British Journal of Cancer* 2004; **90**: 423-9.
- Boldizsár H, Muray T, Szamel I, Szenci O and Csenki J. Studies on canine mammary tumours. II. Oestradiol and progesterone receptor binding capacity and histological type. *Acta Veterinaria Hungarica* 1992; **40**: 89-97.
- Bosetti C, Gallus S and La Vecchia C. Aspirin and cancer risk: an update to 2001. *European Journal of Cancer Prevention* 2002; **11**: 535-42.
- Brodie AM, Lu Q, Long BJ, Fulton A, Chen T, Macpherson N, et al. Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2001; **79**: 41-7.
- Brueggemeier RW, Quinn AL, Parrett ML, Joarder FS, Harris RE and Robertson FM. Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Letters* 1999; **140**: 27-35.
- Brunda MJ, Herberman RB and Holden HT. Inhibition of murine natural killer cell activity by prostaglandins. *Journal of Immunology* 1980; **124**: 2682-7.
- Brunelle M, Sartin EA, Wolfe LG, Sirois J and Dore M. Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Veterinary Pathology* 2006; **43**: 656-66.
- Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC and Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 2005; **294**: 914-23.

- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; **99**: 13926-31.
- Chang SH, Liu CH, Conway R, Han DK, Nithipatikom K, Trifan OC, et al. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; **101**: 591-6.
- Connolly EM, Harmey JH, O'Grady T, Foley D, Roche-Nagle G, Kay E, et al. Cyclooxygenase inhibition reduces tumour growth and metastasis in an orthotopic model of breast cancer. *British Journal of Cancer* 2002; **87**: 231-7.
- Cook NR, Lee IM, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE, et al. Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 2005; **294**: 47-55.
- Coussens LM and Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420**: 860-7.
- Cryer B and Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American Journal of Medicine* 1998; **104**: 413-21.
- Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN, et al. Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Research* 2005; **65**: 3735-44.

Daniel CW, De Ome KB, Young JT, Blair PB and Faulkin LJ, Jr. The in vivo life span of normal and preneoplastic mouse mammary glands: a serial transplantation study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1968; **61**: 53-60.

Delamare J and Garnier M. Dictionnaire des termes de médecine. 26e éd. rev. et augm. / ed. Paris, Maloine, 2000.

Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M, et al. Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 2003; **97**: 2978-87.

Deome KB, Faulkin LJ, Jr., Bern HA and Blair PB. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Research* 1959; **19**: 515-20.

DeWitt DL and Smith WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; **85**: 1412-6.

Doré M, Lanthier I and Sirois J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Veterinary Pathology* 2003; **40**: 207-12.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal* 1998; **12**: 1063-73.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S and DuBois RN.

Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; **107**: 1183-8.

Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A and von Euler H.

Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine* 2005; **69**: 109-27.

Fitzpatrick FA and Soberman R. Regulated formation of eicosanoids. *The Journal of*

Clinical Investigation 2001; **107**: 1347-51.

Fosslien E. Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Annals of Clinical and Laboratory Science 2005; **35**: 347-85.

Fossum TW. Small animal surgery. 2nd ed. St. Louis ; Toronto, Mosby, 2002.

Galbraith EA and McKellar QA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of

piroxicam in dogs. *The Veterinary Record* 1991; **128**: 561-5.

García Rodríguez LA and Gonzalez-Perez A. Risk of breast cancer among users of

aspirin and other anti-inflammatory drugs. *British Journal of Cancer* 2004; **91**: 525-9.

Gierach GL, Lacey JV, Jr., Schatzkin A, Leitzmann MF, Richesson D, Hollenbeck

AR, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Breast Cancer Research : BCR* 2008; **10**: R38.

- Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI and Black MM. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary pathology* 1983; **20**: 127-42.
- Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A and Willett WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Annals of Internal Medicine* 1994; **121**: 241-6.
- Goldberg Y, Nassif, II, Pittas A, Tsai LL, Dynlacht BD, Rigas B, et al. The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins. *Oncogene* 1996; **12**: 893-901.
- Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S and Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2) independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; **98**: 736-47.
- Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, et al. Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Research* 2003; **63**: 906-11.
- Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K and Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Research* 2002; **62**: 1676-81.
- Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H and Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Research* 2000; **60**: 2101-3.

- Harris RE, Chlebowski RT, Jackson RD, Frid DJ, Ascenseo JL, Anderson G, et al. Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative. *Cancer Research* 2003; **63**: 6096-101.
- Heller DA, Clifford CA, Goldschmidt MH, Holt DE, Shofer FS, Smith A, et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Veterinary Pathology* 2005; **42**: 776-80.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM and Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2001; **8**: 97-114.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Patel J, Masferrer JL, Deora A, Hudis C, et al. Celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, protects against human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)/neu-induced breast cancer. *Cancer Research* 2002; **62**: 5405-7.
- Howe LR and Dannenberg AJ. COX-2 inhibitors for the prevention of breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2003; **8**: 31-43.
- Howe LR, Chang SH, Tolle KC, Dillon R, Young LJ, Cardiff RD, et al. HER2/neu-induced mammary tumorigenesis and angiogenesis are reduced in cyclooxygenase-2 knockout mice. *Cancer Research* 2005; **65**: 10113-9.
- Hussain SP, Hofseth LJ and Harris CC. Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2003; **3**: 276-85.
- Hwang D, Scollard D, Byrne J and Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; **90**: 455-60.

- Jacobs EJ, Thun MJ, Connell CJ, Rodriguez C, Henley SJ, Feigelson HS, et al. Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer incidence in a large U.S. cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2005; **14**: 261-4.
- Jessani N, Niessen S, Mueller BM and Cravatt BF. Breast cancer cell lines grown in vivo: what goes in isn't always the same as what comes out. *Cell Cycle* 2005; **4**: 253-5.
- Jhappan C, Morse HC, 3rd, Fleischmann RD, Gottesman MM and Merlino G. DNA PKcs: a T-cell tumour suppressor encoded at the mouse scid locus. *Nature Genetics* 1997; **17**: 483-6.
- Johnson TW, Anderson KE, Lazovich D and Folsom AR. Association of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use with breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2002; **11**: 1586-91.
- Kam PC and See AU. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia* 2000; **55**: 442-9.
- Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC and Dessiris A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine* 2001; **48**: 85-96.

- Kardosh A, Wang W, Uddin J, Petasis NA, Hofman FM, Chen TC, et al. Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2 inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy* 2005; **4**: 571-82.
- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA and Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Research* 1995; **55**: 2556-9.
- Kern MA, Schoneweiss MM, Sahi D, Bahlo M, Haugg AM, Kasper HU, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of human hepatocellular carcinoma implants in nude mice. *Carcinogenesis* 2004; **25**: 1193-9.
- Khan KN, Knapp DW, Denicola DB and Harris RK. Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 2000; **61**: 478-81.
- Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D and Knapp DW. Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Veterinary Pathology* 2001; **38**: 116-9.
- Kis B, Snipes JA and Busija DW. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005; **315**: 1-7.
- Kis B, Snipes JA, Gaspar T, Lenzser G, Tulbert CD and Busija DW. Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse. *Inflammation Research* 2006; **55**: 274-8.

- Knapp DW, Richardson RC, Bottoms GD, Teclaw R and Chan TC. Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1992; **29**: 214-8.
- Knapp DW, Richardson RC, Chan TC, Bottoms GD, Widmer WR, DeNicola DB, et al. Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1994; **8**: 273-8.
- Knapp DW, Glickman NW, Widmer WR, DeNicola DB, Adams LG, Kuczek T, et al. Cisplatin versus cisplatin combined with piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2000a; **46**: 221-6.
- Knapp DW, Glickman NW, DeNicola DB, Bonney PL, Lin TL and Glickman LT. Naturally-occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder A relevant model of human invasive bladder cancer. *Urologic Oncology* 2000b; **5**: 47-59.
- Knottenbelt C, Chambers G, Gault E and Argyle DJ. The in vitro effects of piroxicam and meloxicam on canine cell lines. *The Journal of Small Animal Practice* 2006; **47**: 14-20.
- Krysan K, Reckamp KL, Dalwadi H, Sharma S, Rozengurt E, Dohadwala M, et al. Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor-independent manner. *Cancer Research* 2005; **65**: 6275-81.

- Kumaraguruparan R, Prathiba D and Nagini S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science* 2006; **81**: 218-24.
- Kundu N, Yang Q, Dorsey R and Fulton AM. Increased cyclooxygenase-2 (cox-2) expression and activity in a murine model of metastatic breast cancer. *International Journal of Cancer* 2001; **93**: 681-6.
- Kundu N and Fulton AM. Selective cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer. *Cancer Research* 2002; **62**: 2343-6.
- Kune GA, Kune S and Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. 1988. *International Journal of Epidemiology* 2007; **36**: 951-7.
- Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY and Kweon OK. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science* 2004; **5**: 63-9.
- Levy GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *The FASEB Journal* 1997; **11**: 234-47.
- Li M, Wu X and Xu XC. Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. *Clinical Cancer Research* 2001; **7**: 1010-6.

- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; **276**: 18563-9.
- Marnett LJ. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Research* 1992; **52**: 5575-89.
- Martín de las Mulas J, Ordas J, Millan Y, Fernandez-Soria V and Ramon y Cajal S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Research and Treatment* 2003; **80**: 363-7.
- Matsumoto G, Rahman MA, Muta M, Nakamura T, Bando H, Saji S, et al. DFU, a selective COX-2 inhibitor, suppresses MCF-7 xenograft tumor growth in mice. *Oncology Reports* 2004; **12**: 281-5.
- Mehta RR, Graves JM, Hart GD, Shilkaitis A and Das Gupta TK. Growth and metastasis of human breast carcinomas with Matrigel in athymic mice. *Breast Cancer Research and Treatment* 1993; **25**: 65-71.
- Merlie JP, Fagan D, Mudd J and Needleman P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *The Journal of Biological Chemistry* 1988; **263**: 3550-3.
- Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, et al. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; **22**: 976-84.

- Meuten DJ. Tumors in domestic animals. 4th ed. Ames, Iowa, Iowa State University Press, 2002.
- Millanta F, Citi S, Della Santa D, Porciani M and Poli A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment* 2006; **98**: 115-20.
- Miller FR, Medina D and Heppner GH. Preferential growth of mammary tumors in intact mammary fatpads. *Cancer Research* 1981; **41**: 3863-7.
- Miyamoto T, Ogino N, Yamamoto S and Hayaishi O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 1976; **251**: 2629-36.
- Mohammed SI, Coffman K, Glickman NW, Hayek MG, Waters DJ, Schlittler D, et al. Prostaglandin E2 concentrations in naturally occurring canine cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 2001; **64**: 1-4.
- Mohammed SI, Bennett PF, Craig BA, Glickman NW, Mutsaers AJ, Snyder PW, et al. Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Research* 2002; **62**: 356-8.
- Mohammed SI, Dhawan D, Abraham S, Snyder PW, Waters DJ, Craig BA, et al. Cyclooxygenase inhibitors in urinary bladder cancer: in vitro and in vivo effects. *Molecular Cancer Therapeutics* 2006; **5**: 329-36.

- Muto T, Wakui S, Takahashi H, Maekawa S, Masaoka T, Ushigome S, et al. p53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology* 2000; **37**: 248-53.
- Mutsaers AJ, Mohammed SI, DeNicola DB, Snyder PW, Glickman NW, Bennett PF, et al. Pretreatment tumor prostaglandin E2 concentration and cyclooxygenase-2 expression are not associated with the response of canine naturally occurring invasive urinary bladder cancer to cyclooxygenase inhibitor therapy. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 2005; **72**: 181-6.
- Nelson RW and Couto CG. Small animal internal medicine. 3rd ed. St. Louis, Mo., Mosby, 2003.
- Ogilvie G and Moore A. Managing the veterinary cancer patient: a practice manual. Trenton, Veterinary Learning Systems, 1995.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996; **87**: 803-9.
- Oughton SM and Owen LN. Transplantation of dog neoplasms into the mouse mutant Nude. *Research in Veterinary Science* 1974; **17**: 414-6.
- Pestili de Almeida EM, Piche C, Sirois J and Dore M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2001; **49**: 867-75.

- Price JE, Polyzos A, Zhang RD and Daniels LM. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Research* 1990a; **50**: 717-21.
- Price JE and Zhang RD. Studies of human breast cancer metastasis using nude mice. *Cancer Metastasis Reviews* 1990b; **8**: 285-97.
- Queiroga FL, Alves A, Pires I and Lopes C. Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology* 2007; **136**: 177-85.
- Richards JA, Petrel TA and Brueggemeier RW. Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2002; **80**: 203-12.
- Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Research* 2002; **62**: 632-5.
- Rolland PH, Martin PM, Jacquemier J, Rolland AM and Toga M. Prostaglandin in human breast cancer: Evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *Journal of the National Cancer Institute* 1980; **64**: 1061-70.
- Rungsipipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi N and Hayashi T. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science* 1999; **61**: 27-32.

- Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Research* 1995; **55**: 3785-9.
- Sato T, Yoshinaga K, Okabe S, Okawa T, Higuchi T, Enomoto M, et al. Cyclooxygenase-2 expression and its relationship with proliferation of colorectal adenomas. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2003; **33**: 631-5.
- Schiantarelli P, Acerbi D and Bovis G. Some pharmacokinetic properties and bioavailability by oral and rectal route of piroxicam in rodents and in man. *Arzneimittel-Forschung* 1981; **31**: 92-7.
- Schiffmann S, Maier TJ, Wobst I, Janssen A, Corban-Wilhelm H, Angioni C, et al. The anti-proliferative potency of celecoxib is not a class effect of coxibs. *Biochemical Pharmacology* 2008; **76**: 179-87.
- Schmidt BR, Glickman NW, DeNicola DB, de Gortari AE and Knapp DW. Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001; **218**: 1783-6.
- Schneider R, Dorn CR and Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute* 1969; **43**: 1249-61.
- Schreinemachers DM and Everson RB. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology* 1994; **5**: 138-46.

- Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Research* 2002; **62**: 506-11.
- Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 1999; **282**: 1254-7.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD and DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Research* 1998; **58**: 362-6.
- Sheng H, Shao J, Washington MK and DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; **276**: 18075-81.
- Shiff SJ, Koutsos MI, Qiao L and Rigas B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Experimental Cell Research* 1996; **222**: 179-88.
- Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y and Erikson RL. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; **86**: 1178-82.

- Simon D, Schoenrock D, Baumgartner W and Nolte I. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *Journal of veterinary internal medicine* 2006; **20**: 1184-90.
- Smith WL. Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxygenases. *Trends in Biochemical Sciences* 2008; **33**: 27-37.
- Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, et al. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nature Medicine* 2001; **7**: 1048-51.
- Sorenmo KU, Goldschmidt MH, Shofer FS, Goldkamp C and Ferracone J. Evaluation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression and the effect of cyclooxygenase inhibitors in canine prostatic carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 2004; **2**: 13-23.
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000; **89**: 2637-45.
- Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M and Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 2004; **10**: 8465-71.
- Stack E and DuBois RN. Regulation of cyclo-oxygenase-2. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2001; **15**: 787-800.

- Streppa HK, Jones CJ and Budsberg SC. Cyclooxygenase selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in canine blood. *American Journal of Veterinary Research* 2002; **63**: 91-4.
- Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W and Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; **277**: 18649-57.
- Szlosarek P, Charles KA and Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *European Journal of Cancer* 2006; **42**: 745-50.
- Terry MB, Gammon MD, Zhang FF, Tawfik H, Teitelbaum SL, Britton JA, et al. Association of frequency and duration of aspirin use and hormone receptor status with breast cancer risk. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 2004; **291**: 2433-40.
- Thun MJ, Namboodiri MM and Heath CW, Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *The New England Journal of Medicine* 1991; **325**: 1593-6.
- Tiano HF, Loftin CD, Akunda J, Lee CA, Spalding J, Sessoms A, et al. Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis. *Cancer Research* 2002; **62**: 3395-401.
- Tilley LP and Smith FWK. *The 5-minute veterinary consult : canine and feline*. 3rd ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
- Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton SR, Sinicrope FA and Issa JP. Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. *Cancer Research* 2000; **60**: 4044-8.

- Tsuji M, Kawano S and DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; **94**: 3336-40.
- Ulrich CM, Bigler J and Potter JD. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nature Reviews Cancer* 2006; **6**: 130-40.
- Vane JR, Bakhle YS and Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1998; **38**: 97-120.
- Walden PD, Ruan W, Feldman M and Kleinberg DL. Evidence that the mammary fat pad mediates the action of growth hormone in mammary gland development. *Endocrinology* 1998; **139**: 659-62.
- Wang D and DuBois RN. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; **101**: 415-6.
- Watson J and Chuah SY. Prostaglandins, steroids and human mammary cancer. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology* 1985; **21**: 1051-5.
- Weinberg RA. *The biology of cancer*. New York, Garland Science, 2007.
- Wicha MS, Liotta LA, Garbisa S and Kidwell WR. Basement membrane collagen requirements for attachment and growth of mammary epithelium. *Experimental Cell Research* 1979; **124**: 181-90.
- Williams CS, Mann M and DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999; **18**: 7908-16.

Withrow SJ and Vail DM. Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology. 4th ed. St. Louis, Mo., Saunders Elsevier, 2007.

Wolfe LG, Smith BB, Toivio-Kinnucan MA, Sartin EA, Kwapien RP, Henderson RA, et al. Biologic properties of cell lines derived from canine mammary carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 1986; **77**: 783-92.

Yokoyama C, Takai T and Tanabe T. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Letters* 1988; **231**: 347-51.