



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 9339](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/9339)

To cite this version :

Kuca, Thibaud. *Etude préliminaire de l'usage des inhibiteurs de la COX-2 dans le traitement des tumeurs canines*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2013, 113 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ETUDE PRELIMINAIRE DE L'USAGE DES INHIBITEURS DE LA COX-2 DANS LE TRAITEMENT DES TUMEURS CANINES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

KUCA Thibaud

Né le 21 juillet 1989 à GISORS (27)

Directeur de thèse : M. Maxence DELVERDIER

JURY

PRESIDENT :

Mme Monique COURTADE-SAÏDI

Professeur de l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Maxence DELVERDIER

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Isabelle RAYMOND LETRON

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

Mme Mélanie PASTOR

AERC de l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Marie-Noëlle LUCAS

Ingénieur de recherche de l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Un jour, dit la légende, il y eut un immense incendie de forêt. Tous les animaux terrifiés et atterrés, observaient, impuissants, le désastre. Seul le petit colibri s'active, allant chercher quelques gouttes d'eau dans son bec pour les jeter sur le feu. Au bout d'un moment, le tatou, agacé par ses agissements dérisoires, lui dit : « Colibri ! Tu n'es pas fou ? Tu crois que c'est avec ces gouttes d'eau que tu vas éteindre le feu ? »

« Je le sais, répond le colibri, mais je fais ma part. »

Pierre RABHI

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Monique Courtade-Saïdi,
Professeur de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
Histologie et Cytologie,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Mes hommages respectueux.

A Monsieur le Professeur Maxence Delverdier,
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Anatomie pathologique,

Qui m'a accompagné et m'a permis de réaliser ce travail de thèse,
Mes plus sincères remerciements.

A Madame le Docteur Isabelle Raymond Letron,
Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Anatomie pathologique,

Qui nous a fait le plaisir de participer à notre jury de thèse,
Mes salutations distinguées.

A Madame le Docteur Mélanie Pastor,
Assistant d'enseignement et de recherche contractuel de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Médecine interne,

Qui a initié ce travail, l'a soutenu et nous a fait le plaisir de participer à notre jury de thèse,
Mes salutations distinguées.

A Madame le Docteur Marie-Noëlle Lucas,
Ingénieur de recherche de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
Anatomie pathologique,

Qui a contribué à ce travail et nous a fait le plaisir de participer à notre jury de thèse,
Mes salutations distinguées.

A Madame Catherine Pépin du laboratoire Merial,

Qui a soutenu ce travail de thèse et a permis sa réalisation,
Mes plus sincères remerciements.

Au personnel du Laboratoire d'Anatomie pathologique de l'ENVT,

Sans qui ce travail de thèse n'aurait pu avoir lieu,
Mes plus sincères remerciements.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	13
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ANNEXES	14
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	17
PREMIERE PARTIE	19
<u>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA CYCLO-OXYGENASE EN CANCEROLOGIE</u>	
I. CYCLO-OXYGENASE (COX) ET PROSTAGLANDINES	21
A. Biosynthèse des eicosanoïdes	21
B. Biosynthèse et mode d'action des prostaglandines	22
C. La cyclo-oxygénase (COX)	23
1. La cyclo-oxygénase-1 (COX-1)	24
2. La cyclo-oxygénase-2 (COX-2)	24
a. Expression et rôle de la COX-2	24
b. Régulation de l'expression de la COX-2	25
b.1. Régulation transcriptionnelle de l'expression de la COX-2	25
b.2. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la COX-2	27
c. Localisation subcellulaire de la COX-2	27
3. La cyclo-oxygénase-3 (COX-3) ou cyclo-oxygénase-1b (COX-1b)	28
II. CYCLO-OXYGENASE-2 ET CARCINOGENESE	28
A. La conversion de procarcinogènes en carcinogènes	29
B. La promotion de l'initiation tumorale	29
C. L'échappement à l'apoptose	30
D. L'immunosuppression	30
E. La promotion de l'angiogenèse tumorale	30
F. La promotion de l'invasion tumorale et de l'extension métastatique	31
III. EXPRESSION DE LA COX-2 ET TUMEURS CANINES	32
A. Les carcinomes à cellules transitionnelles	32
B. Les tumeurs mammaires	32
C. Les carcinomes épidermoïdes	33
D. Les tumeurs mélanocytaires	34
E. Les tumeurs prostatiques	34
F. Les tumeurs nasales épithéliales	35
G. Les ostéosarcomes	35
H. Les tumeurs digestives	36
I. Les mastocytomes	36
J. Les autres tumeurs canines exprimant la COX-2	37
K. Les tumeurs canines n'exprimant pas ou rarement la COX-2	37

IV. LIMITES DES ETUDES SUR L'EXPRESSION TUMORALE DE LA COX-2.....	37
A. <i>Le Western blot</i>	38
B. <i>Le dosage immuno-enzymatique</i>	38
C. <i>L'immunohistochimie</i>	38
1. Variabilité de la technique immunohistochimique	39
a. <i>La nature et la dilution de l'anticorps primaire</i>	39
b. <i>Le démasquage antigénique</i>	40
c. <i>La méthode d'amplification et de révélation</i>	41
2. Variabilité de l'évaluation du marquage immunohistochimique anti-COX-2	41
a. <i>L'évaluation de la proportion de cellules tumorales exprimant la COX-2</i>	41
b. <i>L'évaluation de l'intensité du marquage immunohistochimique anti-COX-2</i>	42
c. <i>L'évaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2</i>	42
V. VALEUR PRONOSTIQUE ET PREDICTIVE DE L'EXPRESSION TUMORALE DE LA COX-2 ..	43
VI. INHIBITEURS DE LA COX-2 ET THERAPIE ANTICANCEREUSE	44
A. <i>Rappels sur les inhibiteurs de la COX-2 et leur mode d'action</i>	44
1. Les inhibiteurs COX-1 préférentiels	45
2. Les inhibiteurs non sélectifs	45
3. Les inhibiteurs COX-2 préférentiels	45
4. Les inhibiteurs COX-2 sélectifs	46
B. <i>Cibles des inhibiteurs de la COX-2 indépendantes de la COX-2</i>	46
C. <i>Inhibiteurs de la COX-2 et cultures de cellules tumorales</i>	46
D. <i>Inhibiteurs de la COX-2 et chimioprévention</i>	47
E. <i>Inhibiteurs de la COX-2 et traitement des tumeurs</i>	47
1. Inhibiteurs de la COX-2 et chimiothérapie conventionnelle	47
2. Inhibiteurs de la COX-2 et chimiothérapie métronomique	47
3. Inhibiteurs de la COX-2 et radiothérapie	48
4. Inhibiteurs de la COX-2 et inhibiteurs de l'EGFR	48
5. Inhibiteurs de la COX-2 et traitement de la douleur d'origine cancéreuse	48
6. Inhibiteurs de la COX-2 et traitement des tumeurs canines	48
VII. LA CYCLO-OXYGENASE-2 EN CANCEROLOGIE HUMAINE.....	51
A. <i>Expression de la COX-2 et tumeurs solides humaines</i>	51
B. <i>Perspectives thérapeutiques</i>	51
VIII. CONCLUSION	51
DEUXIEME PARTIE	19

ETUDE PRELIMINAIRE DE L'USAGE DES INHIBITEURS DE LA COX-2
DANS LE TRAITEMENT DES TUMEURS CANINES

I. MATERIEL ET METHODES	55
A. <i>Inclusion des cas</i>	55
B. <i>Matériel tumoral</i>	55
C. <i>Données cliniques et paracliniques</i>	55
D. <i>Technique histopathologique conventionnelle</i>	55
E. <i>Technique de détection immunohistochimique de la COX-2</i>	56
1. Anticorps primaire	56
2. Essais préliminaires	56

3. Immunomarquages	56
<i>a. Démasquage antigénique</i>	57
<i>b. Principales étapes techniques</i>	57
4. Contrôles	57
<i>F. Lecture et interprétation des lames</i>	57
1. Analyse histopathologique	57
2. Analyse immunohistochimique	58
<i>G. Evolution clinique et traitement inhibiteur de la COX-2</i>	59
II. RESULTATS.....	60
<i>A. Caractéristiques épidémiologiques de la population</i>	60
<i>B. Résultats de l'analyse histopathologique</i>	61
<i>C. Résultats de l'analyse immunohistochimique</i>	61
1. Contrôles	61
2. Evaluation du marquage immunohistochimique anti-COX-2	62
<i>a. Caractéristiques du marquage immunohistochimique anti-COX-2</i>	62
<i>b. Qualité et répartition du marquage immunohistochimique anti-COX-2</i>	62
<i>c. Evaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2</i>	63
<i>D. Résultats anatomo-cliniques</i>	66
1. Tolérance du traitement inhibiteur de la COX-2	66
2. Evolution clinique et traitement inhibiteur de la COX-2	69
3. Potentiel métastatique et récurrence locale	71
4. Durée de vie	71
III. DISCUSSION	72
<i>A. Limites et reproductibilité de la méthode</i>	72
1. Echantillonnage	72
2. Détection immunohistochimique de la COX-2	73
3. Evaluation du marquage immunohistochimique anti-COX-2	73
<i>B. Traitement inhibiteur de la COX-2 et tolérance</i>	74
<i>C. Expression tumorale de la COX-2 et caractéristiques histologiques</i>	74
1. Expression tumorale de la COX-2 et type tumoral	74
2. Expression tumorale de la COX-2 et type histologique	75
<i>D. Valeur pronostique et prédictive de l'expression tumorale de la COX-2</i>	75
1. Expression tumorale de la COX-2 et évolution clinique	76
2. Expression tumorale de la COX-2 et potentiel métastatique	78
3. Expression tumorale de la COX-2 et récurrence locale	79
<i>E. Perspectives</i>	79
CONCLUSION	81
ANNEXES	101

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : La famille des eicosanoïdes (adaptée de lipidlibrary.aocs.org⁴)</i>	21
<i>Figure 2 : Dérivés de la prostaglandine H₂ (adaptée de lipidlibrary.aocs.org⁴)</i>	22
<i>Figure 3 : Dérivés de la cyclo-oxygénase-1 (adaptée de Flory et al.⁴²)</i>	24
<i>Figure 4 : Dérivés de la cyclo-oxygénase-2 (adaptée de Flory et al.⁴²)</i>	25
<i>Figure 5 : Régulation transcriptionnelle de la COX-2 (adaptée de Rodrigues et al.¹⁶¹)</i>	26
<i>Figure 6 : Régulation post-transcriptionnelle de la COX-2 (adaptée de Rodrigues et al.¹⁶¹)</i>	27
<i>Figure 7 : Implication de la COX-2 dans la carcinogenèse (adaptée de Rodrigues et al.¹⁶¹)</i>	29
<i>Figure 8 : Répartition des cas selon l'âge au moment du diagnostic</i>	60
<i>Figure 9 : Mise en évidence d'une immunoréactivité dans un seul nodule tumoral (cas n°9)</i>	62
<i>Figure 10 : Variabilité de l'intensité du marquage des cellules tumorales (cas n°17)</i>	65

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (adapté de Liao et al.¹⁰²)</i>	23
<i>Tableau 2 : Expression de la COX-2 et carcinomes à cellules transitionnelles canins</i>	32
<i>Tableau 3 : Expression de la COX-2 et tumeurs mammaires canines</i>	33
<i>Tableau 4 : Expression de la COX-2 et carcinomes épidermoïdes canins</i>	34
<i>Tableau 5 : Expression de la COX-2 et tumeurs mélanocytaires canines</i>	34
<i>Tableau 6 : Expression de la COX-2 et tumeurs prostatiques canines</i>	35
<i>Tableau 7 : Expression de la COX-2 et tumeurs nasales épithéliales canines</i>	35
<i>Tableau 8 : Expression de la COX-2 et ostéosarcomes canins</i>	36
<i>Tableau 9 : Expression de la COX-2 et tumeurs digestives canines</i>	36
<i>Tableau 10 : Expression de la COX-2 et mastocytomes canins</i>	36
<i>Tableau 11 : Les autres tumeurs canines exprimant la COX-2</i>	37
<i>Tableau 12 : Les tumeurs canines n'exprimant pas ou rarement la COX-2</i>	37
<i>Tableau 13 : Mise en évidence de l'expression de la COX-2 par IHC et Western blot</i>	38
<i>Tableau 14 : Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie (adapté de Doré et al.³³)</i>	40
<i>Tableau 15 : Méthode de marquage enzymatique streptavidine-biotine-peroxydase</i>	41
<i>Tableau 16 : Evaluation de la proportion de cellules tumorales exprimant la COX-2</i>	42
<i>Tableau 17 : Evaluation de l'intensité du marquage immunohistochimique anti-COX-2</i>	42
<i>Tableau 18 : Evaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2</i>	43
<i>Tableau 19 : Evaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2 par Millanta et al.^{116,117}</i>	43
<i>Tableau 20 : Inhibiteurs de la COX-2 et traitement des tumeurs canines</i>	50
<i>Tableau 21 : La COX-2 en cancérologie humaine et canine (adapté de Liao et al.¹⁰²)</i>	52
<i>Tableau 22 : Evaluation de la proportion de cellules tumorales exprimant la COX-2</i>	58
<i>Tableau 23 : Evaluation de l'intensité du marquage anti-COX-2 des cellules tumorales</i>	59
<i>Tableau 24 : Evaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2</i>	59
<i>Tableau 25 : Répartition des cas selon la race</i>	61
<i>Tableau 26 : Répartition des cas selon le type tumoral</i>	61

<i>Tableau 27 : Evaluation de la qualité et de la répartition du marquage anti-COX-2</i>	63
<i>Tableau 28 : Evaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2</i>	64
<i>Tableau 29 : Traitement inhibiteur de la COX-2</i>	66
<i>Tableau 30 : Tolérance du traitement inhibiteur de la COX-2</i>	68
<i>Tableau 31 : Evolution clinique et traitement inhibiteur de la COX-2</i>	70
<i>Tableau 32 : Potentiel métastatique et récurrence locale</i>	71
<i>Tableau 33 : Durée de vie</i>	72
<i>Tableau 34 : Marquage immunohistochimique anti-COX-2 et type tumoral</i>	74
<i>Tableau 35 : Expression tumorale de la COX-2 et carcinomes mammaires</i>	75
<i>Tableau 36 : Expression tumorale de la COX-2 et carcinomes nasaux</i>	75
<i>Tableau 37 : Expression tumorale de la COX-2 et évolution clinique</i>	77
<i>Tableau 38 : Expression tumorale de la COX-2 et potentiel métastatique (1)</i>	78
<i>Tableau 39 : Expression tumorale de la COX-2 et potentiel métastatique (2)</i>	78
<i>Tableau 40 : Expression tumorale de la COX-2 et récurrence locale (1)</i>	79
<i>Tableau 41 : Expression tumorale de la COX-2 et récurrence locale (2)</i>	79
<i>Tableau 42 : Critères histologiques des carcinomes mammaires canins</i>	80
<i>Tableau 43 : Grading histologique des carcinomes mammaires canins</i>	80

LISTE DES ANNEXES

<i>Annexe 1 : L'expression de la COX-2 dans les tumeurs canines</i>	103
<i>Annexe 2 : Détection immunohistochimique de la COX-2 sur des coupes tissulaires de prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine à l'aide de l'anticorps M3617</i>	104
<i>Annexe 3 : Résultats de l'analyse histopathologique</i>	105
<i>Annexe 4 : Résultats de la détection immunohistochimique de la COX-2</i>	107

LISTE DES ABREVIATIONS

[AA]	acide arachidonique
[ADN]	acide désoxyribonucléique
[AINS]	anti-inflammatoire non stéroïdien
[AMP _c]	adénosine monophosphate cylique
[AP1]	activator protein 1
[AP2]	activator protein 2
[ARE]	adenylate-uridylylate-rich element
[ARN _m]	acide ribonucléique messenger
[ATF]	activating transcription factor
[AUF1]	ARE-binding factor 1
[Bcl-2]	B-cell lymphoma-2
[bFGF]	basic fibroblast growth factor
[Ca ²⁺]	calcium ionisé
[CBF-A]	carG box-binding factor-A
[C/EBP]	CCAAT/enhancer binding protein
[COX]	cyclo-oxygénase
[CRE]	cyclic AMP response element
[CREB]	cyclic AMP response element binding
[CSF]	colony stimulating factor
[CUGBP2]	CUG-binding protein 2
[DES]	diéthylstilbestrol
[DGLA]	di-homo- γ -linolenic acid
[Ebox]	enhancer box
[EGF]	epidermal growth factor
[EGFR]	epidermal growth factor receptor
[EGR-1]	early growth response-1
[EIA]	enzyme immunoassay
[ENVT]	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
[EPA]	eicosapentaenoic acid
[ERK/MAPK]	extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase
[FSH]	follicle stimulating hormone
[Her-2/neu]	human epidermal growth factor receptor-2
[hnRNP A0]	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0
[HuR]	human antigen R
[HUVEC]	human umbilical vein endothelial cells
[IHC]	immunohistochimie
[IL]	interleukin
[LH]	luteinizing hormone
[M]	mol.L ⁻¹
[MDA]	malonaldéhyde
[MEC]	matrice extracellulaire
[MMPs]	métalloprotéases matricielles
[mPGES]	membrane prostaglandin E synthase

[NAG-1]	NSAID-activated gene-1
[NF-κB]	nuclear factor-κB
[NFIL6]	nuclear factor interleukin 6
[PBS]	phosphate buffered saline
[PDGF]	platelet-derived growth factor
[PK1]	3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1
[PG]	prostaglandine
[PGES]	prostaglandin E synthase
[PGHS]	prostaglandin H synthase
[PGI₂]	prostaglandine I ₂
[PI3K]	phosphatidyl inositol-3 kinase
[PKB]	protein kinase B
[PKC]	protein kinase C
[PMA]	phorbol myristate acetate
[PPAR]	peroxisome proliferator activated receptor
[Ptgs2]	prostaglandin-endoperoxide synthase-2
[Ras]	rous sarcoma virus
[RCPG]	récepteurs couplés aux protéines G
[RE]	réticulum endoplasmique
[SERCA]	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
[SP1]	specificity protein 1
[Src]	sarcoma
[TGF-α]	transforming growth factor-α
[TGF-β]	transforming growth factor-β
[TGFβ2-R]	transforming growth factor β2 receptor
[TNF-α]	tumor necrosis factor-α
[TSP-1]	thrombospondin-1
[TXA₂]	thromboxane A ₂
[VEGF]	vascular endothelial growth factor
[WB]	Western blot
[Wnt-1]	wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member-1

INTRODUCTION

La cyclo-oxygénase (COX) est un complexe multienzymatique dont les deux isoformes, COX-1 et COX-2, catalysent notamment l'étape initiale de formation des prostaglandines de la série 2 à partir de l'acide arachidonique (AA). La COX-1 est l'isoforme constitutive de la COX qui est impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire tandis que la COX-2 est l'isoforme inductible qui est impliquée dans la synthèse de la majorité des prostaglandines de la réaction inflammatoire.

Depuis quelques années, l'implication de la COX-2 dans la carcinogenèse est devenue de plus en plus évidente. Elle a en effet été mise en évidence dans au moins six mécanismes : la conversion de procarcinogènes en carcinogènes, la promotion de l'initiation tumorale, l'échappement à l'apoptose, l'immunosuppression et la promotion de l'angiogenèse tumorale, de l'invasion tumorale et de l'extension métastatique¹⁶¹.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) bloquent, de manière plus ou moins sélective, l'activité des deux isoformes de la cyclo-oxygénase.

Dans l'espèce humaine, des études épidémiologiques et cliniques ont suggéré que les inhibiteurs de la COX-2 pouvaient être bénéfiques dans le traitement de la douleur d'origine cancéreuse, dans la prévention des tumeurs solides et enfin dans le traitement de ces tumeurs lorsqu'ils étaient associés avec une chirurgie, une chimiothérapie ou une radiothérapie^{75,111}.

Dans l'espèce canine, des études cliniques ont pu montrer que les inhibiteurs de la COX-2, administrés seuls ou en association avec des agents de chimiothérapie conventionnelle, étaient à l'origine d'une meilleure évolution clinique. Ces résultats ont été obtenus dans les carcinomes vésicaux à cellules transitionnelles, les carcinomes mammaires inflammatoires et les carcinomes prostatiques^{26,88,89,101,106,118,176}. Le piroxicam et le firocoxib ont été les inhibiteurs de la COX-2 les plus fréquemment utilisés dans ces études cliniques.

La COX-2 constitue donc une cible pharmacologique prometteuse, en oncologie canine, dans le traitement des tumeurs. Les perspectives sont d'autant plus grandes que les inhibiteurs de la COX-2 sont mieux tolérés et plus spécifiques que les agents cytotoxiques couramment utilisés en médecine vétérinaire qui ciblent, à la fois, le métabolisme des acides nucléiques des cellules tumorales et celui des cellules saines.

Dans l'espèce canine, bien que les études sur l'expression tumorale de la COX-2 et la tolérance des inhibiteurs de la COX-2 soient de plus en plus nombreuses, on en recense très peu sur la valeur prédictive de l'expression de la COX-2 c'est à dire sa relation éventuelle avec l'effet antitumoral des inhibiteurs de la COX-2.

Les études cliniques sur la valeur pronostique de l'expression tumorale de la COX-2 restent par ailleurs limitées. Il est en effet nécessaire de distinguer la valeur pronostique qui permet d'évaluer l'effet des caractéristiques du patient ou de la tumeur sur l'évolution clinique de la valeur prédictive qui permet d'évaluer l'effet du traitement sur la tumeur⁷².

Le premier objectif de cette étude préliminaire était de mettre au point une technique standardisée de détection immunohistochimique de la COX-2 dans le but d'évaluer rétrospectivement son expression dans des tumeurs canines malignes d'origine épithéliale ou mésenchymateuse. Le second objectif était d'évaluer la tolérance et l'efficacité clinique des inhibiteurs de la COX-2 dans le traitement de ces tumeurs solides.

Nous avons également tenté d'évaluer les relations éventuelles entre l'expression de la COX-2 et des données anatomo-cliniques : potentiel métastatique, récurrence locale et efficacité clinique des inhibiteurs de la COX-2.

Cette étude préliminaire est introduite par une revue bibliographique consacrée à la place de la cyclo-oxygénase en cancérologie canine et humaine. Elle est tout particulièrement axée sur les données récentes concernant le rôle de la COX-2 dans la carcinogenèse et celui des inhibiteurs de la COX-2 dans le traitement des tumeurs canines.

Cette étude préliminaire compare enfin les résultats obtenus aux données rapportées dans la littérature et met en perspective l'intérêt de la détection immunohistochimique de la COX-2 dans l'évaluation pronostique et le traitement des tumeurs canines.

PREMIERE PARTIE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA CYCLO-OXYGENASE EN CANCEROLOGIE

I. CYCLO-OXYGENASE (COX) ET PROSTAGLANDINES

A. Biosynthèse des eicosanoïdes^{4,77}

Les **eicosanoïdes** sont des **lipides** non saturés à chaîne courte produits par l'oxydation d'**acides gras** poly-insaturés à **20 atomes de carbone** tels que l'acide dihomog- γ -linoléique (20:3 Δ 8,11,14), l'acide arachidonique (20:4 Δ 6,9,12,15) et l'acide eicosapentaénoïque (20:5 Δ 3,6,9,12). On distingue au sein de la famille des eicosanoïdes, **les lipoxines**, **les leucotriènes** et **les prostanoides** en fonction de l'enzyme qui catalyse leur formation, respectivement **la 5-lipoxygénase**, **la 15-lipoxygénase** et **la cyclo-oxygénase** (figure 1).

Au sein des **prostanoides**, on distingue les prostaglandines (PG) qui se caractérisent par un **cycle pentagonal à 5 carbones**, des thromboxanes et des prostacyclines (figure 1).

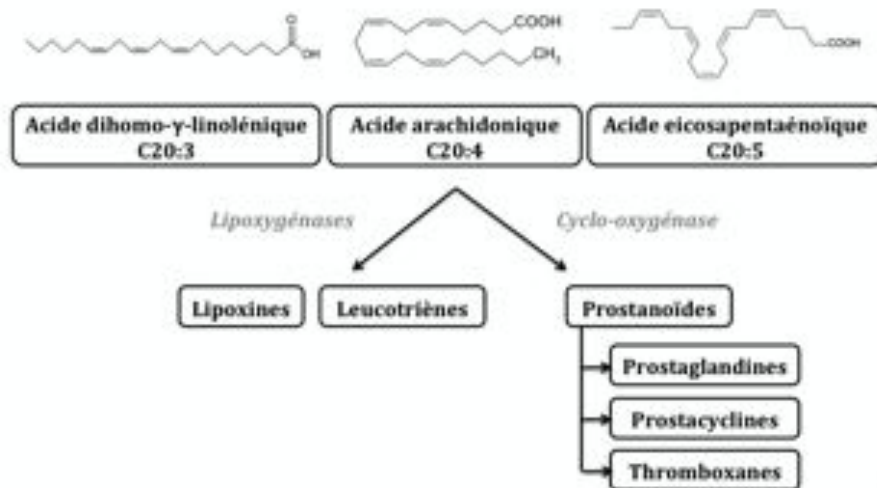


Figure 1 : La famille des eicosanoïdes (adaptée de lipidlibrary.aocs.org⁴)

La biosynthèse des **prostanoides** se réalise à partir de **trois acides gras** poly-insaturés à **20 atomes de carbone** (figure 1). Le nombre d'insaturations du précurseur détermine la série du prostanoides. Ainsi, **l'acide dihomog- γ -linoléique** (DGLA), **l'acide arachidonique** (AA) et **l'acide eicosapentaénoïque** (EPA) sont respectivement à l'origine des prostanoides de la série 1, 2 et 3. Le numéro de la série fait référence au nombre d'insaturations sur les chaînes latérales du prostanoides produit et non à celui du précurseur.

Le précurseur de la série 2, **l'acide arachidonique** (AA) est ainsi transformé successivement en prostaglandine G₂ (PGG₂) puis en **prostaglandine H₂** (PGH₂) par un complexe **multienzymatique** membranaire appelé **cyclo-oxygénase** (COX). La PGH₂ est le précurseur immédiat de toutes les prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes de la **série 2** (figure 2). L'acide arachidonique (AA) est un élément constitutif des membranes cellulaires qui est libéré par hydrolyse enzymatique à partir des **phospholipides membranaires**.

C'est l'expression **sélective** dans certains tissus ou types cellulaires d'enzymes de type **isomérase**, **synthase** et **réductase** qui permet ensuite la conversion de la PGH₂ en prostanoides de la série 2 (figure 2). Ces enzymes sont situées à proximité de la COX sur la **face cytoplasmique du réticulum endoplasmique** (RE).

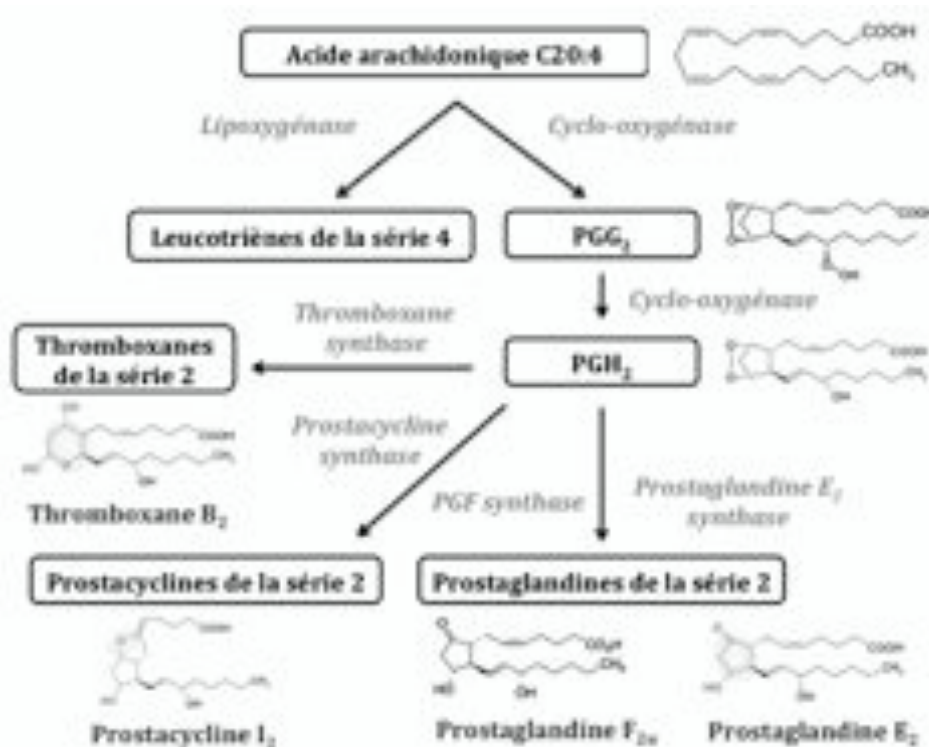


Figure 2 : Dérivés de la prostaglandine H₂ (adaptée de lipidlibrary.aocs.org⁴)

B. Biosynthèse et mode d'action des prostaglandines^{4,77}

Les prostaglandines jouent un rôle essentiel dans plusieurs grandes fonctions physiologiques telles que la **protection de la muqueuse digestive, l'hémodynamique rénale, l'hémostase primaire, la régulation du tonus vasculaire, l'ovulation, la gestation et la parturition**. Cependant, les prostaglandines sont également impliquées dans des processus de prolifération cellulaire et d'immunomodulation. Elles contribuent ainsi directement à la genèse de la **réaction inflammatoire et à la carcinogénèse**.

Elles sont habituellement considérées comme des hormones locales ou **autocrines** car elles agissent à proximité de leur lieu de synthèse. Certaines d'entre elles exercent également une action paracrine grâce à un transport facilité par des transporteurs spécifiques.

Les prostaglandines agissent principalement en se liant de manière spécifique à des **récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG)** qui sont subdivisés en cinq classes chez l'Homme et la souris. La prostaglandine E₂ (PGE₂) est capable de se fixer à quatre récepteurs membranaires spécifiques, désignés EP₁ à EP₄. Actuellement, le rôle de chaque récepteur EP n'est pas exactement connu. Il semble cependant que des récepteurs différents soient impliqués selon les stades de la carcinogénèse et selon les types tumoraux^{46,197}. L'activation des récepteurs **RCPG** engendre une variation immédiate dans la synthèse des seconds messagers intracellulaires (AMP_c et Ca²⁺), une modification du potentiel membranaire ou l'activation d'une protéine kinase spécifique.

La description du rôle des prostaglandines est **complexe** car une même prostaglandine peut avoir des fonctions biologiques différentes, parfois opposées, **selon le type cellulaire, la nature du stimulus et le type de récepteur**. Par exemple, la PGE₂ peut avoir une action pro ou anti-inflammatoire en fonction du récepteur sur lequel elle se fixe.

On retiendra que **la PGE₂** est la **première** prostaglandine produite au niveau des sites d'inflammation, qu'elle contribue et module **la réponse inflammatoire** en entraînant de nombreux effets tels que la douleur, la chaleur, la vasodilatation et la formation d'œdème.

C. La cyclo-oxygénase (COX)^{158,161}

Le complexe multienzymatique COX est également connu sous le nom de prostaglandine H synthase (PGHS) ou de prostaglandine endo synthase (PGES). Il est constitué d'une **glycoprotéine membranaire homodimérique** composée de deux sous unités d'environ 70 000 daltons et d'un **noyau hème** qui possède **deux activités catalytiques** : une activité **peroxydase** et une **activité cyclo-oxygénase**. On donne couramment à ce complexe le nom de COX en référence à son activité cyclo-oxygénase.

Au niveau de l'hème, le premier site catalyse une réaction d'**oxydation**, l'addition de deux molécules d'O₂ sur l'acide arachidonique pour former la PGG₂. Le deuxième site catalyse une réaction de **réduction**, la transformation de la fonction hydroperoxyde de la PGG₂ en groupement hydroxyde pour former la PGH₂. Cette synthèse a lieu généralement sur la **face luminale du réticulum endoplasmique (RE)** et requiert l'interaction du deuxième site avec des composés hydroperoxydes.

On connaît actuellement **deux isoformes** de cette enzyme. La première isoforme, **COX-1**, a été identifiée dans les années **1970** par **Sir John Vane** comme la cible de l'action de l'aspirine et d'autres anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)¹⁹⁴. Plus tardivement, au début des années **1990**, l'existence d'une seconde isoforme **inductible**, COX-2, a été mise en évidence^{76,134}. Il a ensuite été montré que ces deux isoformes étaient encodées par deux gènes différents situés sur deux chromosomes distincts bien qu'elles partagent 60 à 65% de leur composition en acides aminés^{69,204}. Parmi les principales différences existantes entre ces deux isoformes, on retiendra que :

- elles diffèrent surtout par leurs extrémités N et C-terminales, ce qui est mis à profit pour fabriquer des **anticorps spécifiques** dirigés contre l'une des deux isoformes.
- la COX-2 a une sélectivité de substrat plus large que celle de la COX-1 ce qui lui permet de synthétiser **une plus grande variété de prostanoïdes**.
- la COX-2 est beaucoup **plus sensible au tonus peroxydasique**, de sorte qu'en présence d'un taux faible d'hydroperoxydes, l'AA sera métabolisé **préférentiellement** par la COX-2.

	COX-1	COX-2
<i>Expression</i>	constitutive	inductible
<i>Taille du gène</i>	22 kb	8,3 kb
<i>ARNm</i>	2,7 kb	4,5 kb
<i>Poids moléculaire</i>	67 kDa	72 kDa
<i>Localisation cellulaire</i>	réticulum endoplasmique et enveloppe nucléaire	
<i>Expression tissulaire</i>	la plupart des tissus (estomac, rein, côlon...)	un nombre limité de tissus (SNC, rein, placenta, testicule, prostate)

kb : kilobase ; kDa : kilodalton

Tableau 1 : Les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (adapté de Liao et al.¹⁰²)

1. La cyclo-oxygénase-1 (COX-1)

L'isoforme COX-1 est la forme constitutive de la COX, c'est une enzyme dite de maintenance **synthétisée physiologiquement par un grand nombre de cellules et de tissus** à l'origine des prostaglandines impliquées dans **le maintien de l'homéostasie tissulaire et les signaux intercellulaires**. La COX-1 est exprimée au niveau de l'estomac, des reins, du tractus génital femelle, des plaquettes, des poumons, de l'intestin grêle, du gros intestin et du côlon. Elle est ainsi à l'origine des prostaglandines et des prostacyclines qui contribuent à la **protection de la muqueuse gastrique**. Au niveau rénal, son activité engendre une vasodilatation permettant le maintien de la perfusion rénale et du débit de filtration glomérulaire. Elle contribue ainsi à la **prévention de l'ischémie tissulaire en cas d'hypotension**. La COX-1 est par ailleurs à l'origine de thromboxanes qui sont de puissantes inductrices de **l'agrégation plaquettaire** (figure 3).

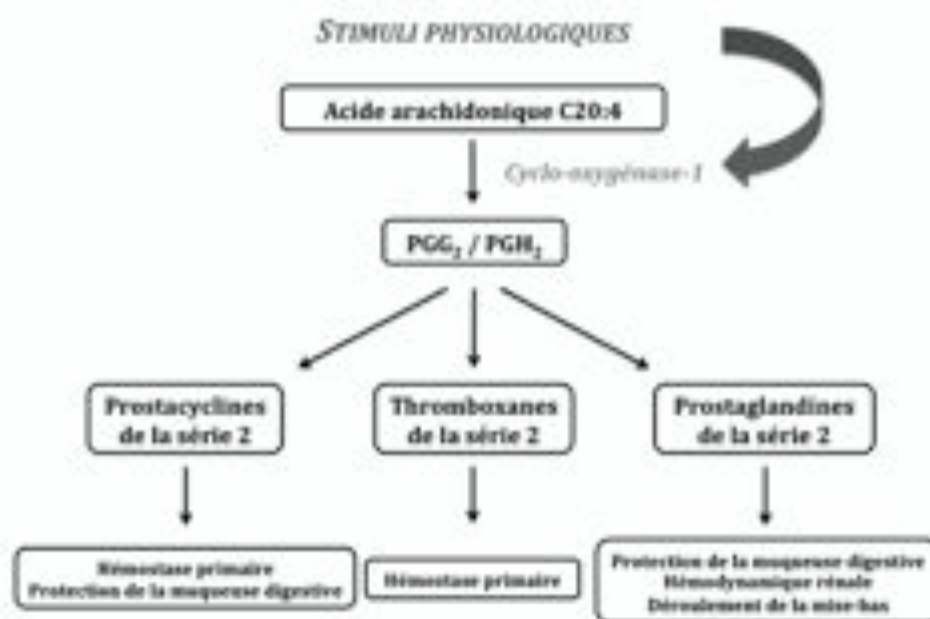


Figure 3 : Dérivés de la cyclo-oxygénase-1 (adaptée de Flory et al.⁴²)

2. La cyclo-oxygénase-2 (COX-2)

a. Expression et rôle de la COX-2

Contrairement à la COX-1, l'isoforme COX-2 est une enzyme **inductible, synthétisée physiologiquement dans un nombre très limité de tissus** qui sont le placenta, le système nerveux central, la prostate, les testicules et le rein²⁰⁰. Elle est impliquée dans de nombreuses étapes de la **reproduction** incluant l'ovulation, la fécondation, l'implantation embryonnaire, le développement placentaire et la parturition.

La COX-2 peut cependant être exprimée par **un nombre important de types cellulaires** parmi lesquels les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les chondrocytes, les fibroblastes, les monocytes, les macrophages et les cellules synoviales.

Dans les tissus tumoraux, sa présence est mise en évidence à la fois dans des cellules **tumorales** et dans des cellules **non tumorales** (inflammatoires, endothéliales ou stromales).

Dans la grande majorité des cas, l'expression de la COX-2 est induite, **en conditions pathologiques**, par un ensemble **d'agents pro-inflammatoires** (LPS), **de cytokines** (IL-1 β , IL-2) et **de facteurs de croissance** (EGF, PDGF, TGF- β) *via* des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels^{44,161}. Son expression peut également être induite par des **carcinogènes**, des **oncogènes** (Ras, Her-2/neu, Wnt-1) et des **promoteurs de tumeurs**.

On retiendra que le rôle principal de la COX-2 est de contribuer à la production de **PGE₂**, une prostaglandine jouant un rôle clé dans la modulation de **la réponse inflammatoire**. Cette isoforme régule également la synthèse de **malonaldéhyde** (MDA) et la production de **radicaux libres hydroperoxydes** (ROO \cdot) qui permettent la conversion de procarcinogènes en carcinogènes (benzo[a]pyrène et benzidine diamine) (figure 4).

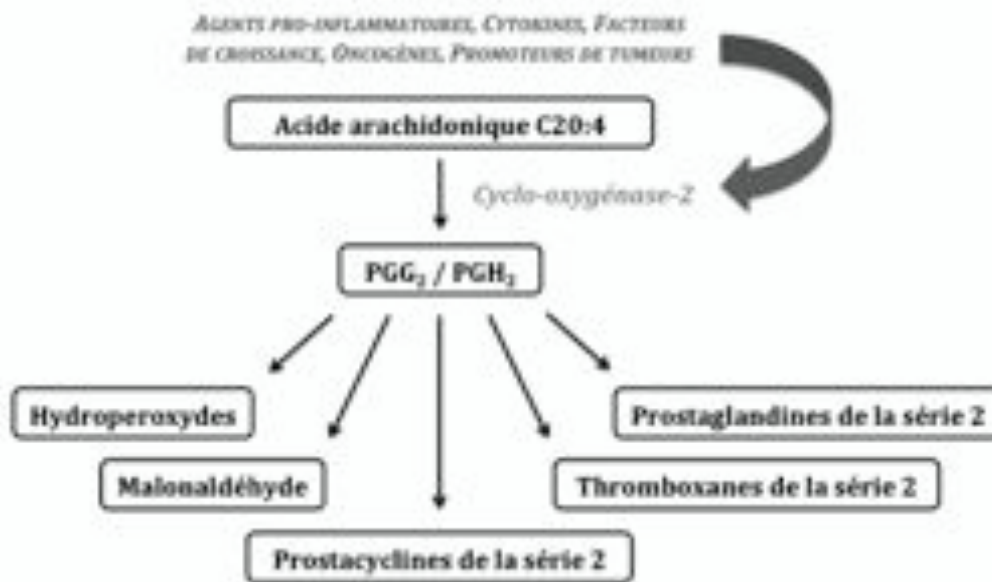


Figure 4 : Dérivés de la cyclo-oxygénase-2 (adaptée de Flory et al.⁴²)

b. Régulation de l'expression de la COX-2^{158,161}

La COX-2 humaine est le produit d'un gène dénommé **Ptgs2**, de petite taille (8,3kb) localisé sur le chromosome 1 qui est induit au cours des phases précoces de l'inflammation et de carcinogenèse. Sa taille inférieure à 10kb lui permet d'être rapidement transcrit, facilitant ainsi sa maturation et permettant d'apporter une réponse **immédiate et adaptée** au stress cellulaire. La présence de nombreux **éléments de réponse aux facteurs de transcription** sur le **promoteur** du gène Ptgs2 montre que ce gène peut faire l'objet d'une **régulation transcriptionnelle**. Les nombreuses **séquences d'instabilité** présentes par ailleurs dans la région 5' non traduite de son ARN messager (ARN_m) témoignent d'une possibilité de **régulation post-transcriptionnelle**.

b.1. Régulation transcriptionnelle de l'expression de la COX-2^{37,73,182}

La régulation transcriptionnelle de la COX-2 fait appel à des réseaux de signalisation complexes initiés par des récepteurs **RCPG**. Leur activation conduit à l'induction transcriptionnelle du gène de la COX-2 **sans affecter la synthèse de l'isoforme constitutive**.

Les **facteurs de croissance** (EGF, PDGF, TGF- α , TGF- β), les **cytokines** et les **acides biliaires** sont autant de composés susceptibles d'activer ces récepteurs membranaires.

Au cours de l'induction transcriptionnelle, le premier relais de signalisation cytoplasmique mobilise, dans la majorité des cas, **la voie des MAP kinases** (Mitogen-Activated Protein) et celle **des protéines kinases de type C** (PKC). Ces voies convergent vers la translocation dans le noyau de **facteurs de transcription** susceptibles de se fixer sur le promoteur du gène *Ptgs2*. Celui-ci contient en effet une boîte régulatrice de type **TATA box** et de nombreux **éléments de réponse** de type CRE, Ebox, NFIL6, AP2, SP1 et NF- κ B sur lesquels les facteurs de transcription de type AP1, la famille ATF, la protéine CREB, C/EBP ou NF- κ B sont susceptibles de se fixer (figure 5).

Ces voies sont régulées directement par certains **oncogènes** (Src et Ras). Le promoteur du gène *Ptgs2* est par ailleurs régulé **négativement** par les **glucocorticoïdes**, notamment la dexaméthasone, **les cytokines anti-inflammatoires** IL-4 et IL-10 et des **agents chimiopréventifs** tels que le resvératrol, l'acide rétinoïque et le carnosol. **Les produits de la COX-2** exercent également un **rétrocontrôle négatif** par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires **PPAR**¹⁸¹. De manière physiologique, les **hormones du cycle menstruel**, la FSH, la LH et les œstrogènes régulent l'induction transcriptionnelle du gène *Ptgs2* dans les différentes étapes de la reproduction par une autre voie de signalisation cytoplasmique celle des **PI3K/PDK1/PKB**¹⁴⁰.

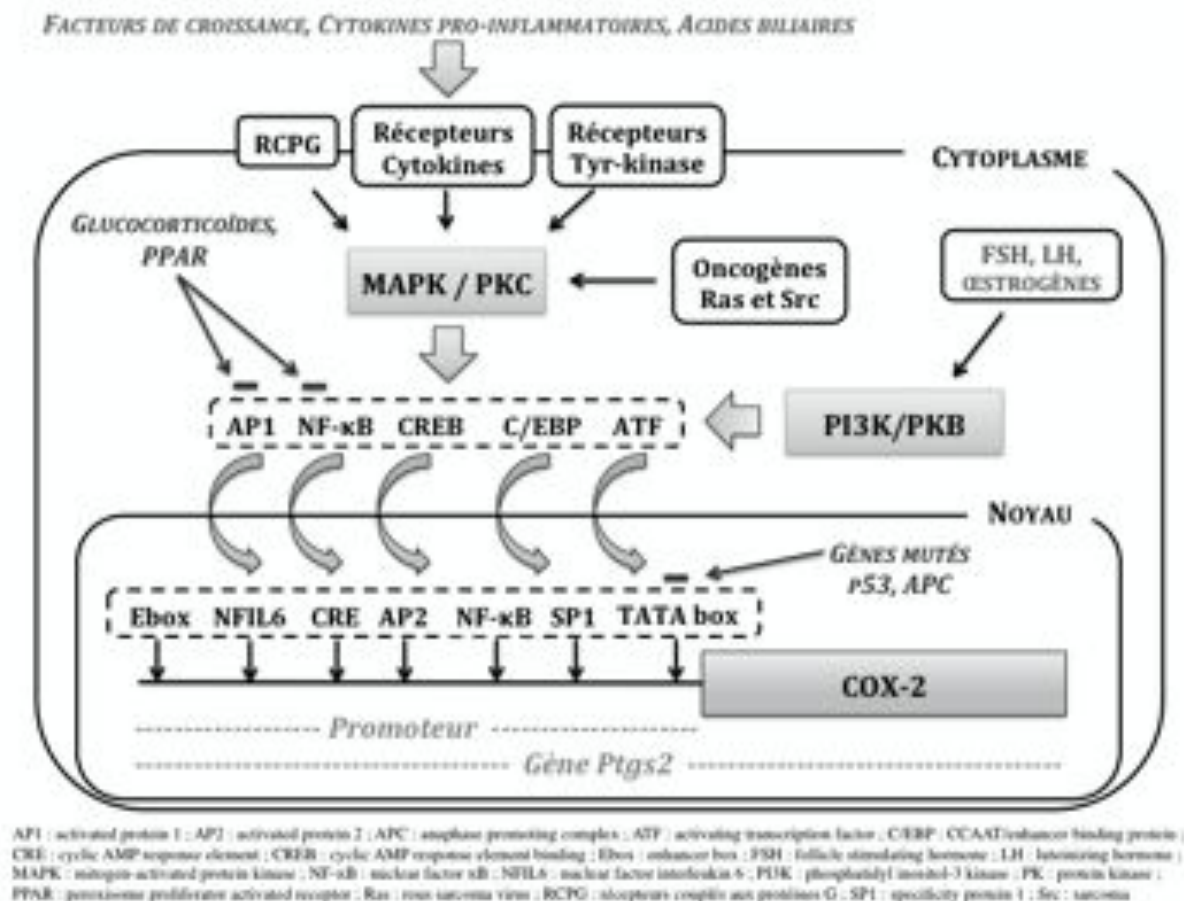


Figure 5 : Régulation transcriptionnelle de la COX-2 (adaptée de Rodrigues et al.¹⁶¹)

b.2. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la COX-2¹⁶¹

L'expression de la COX-2 résulte de l'activation de la transcription du gène Ptg2 et de **régulations post-transcriptionnelles** caractérisées par la **stabilisation** du messager et de la protéine COX-2. L'instabilité de l'ARN_m est liée à la présence d'une **séquence AUUUA** répétée et très conservée à son extrémité 3' qui constitue un domaine **ARE** (Adenylate-uridylylate-Rich Element). Des **protéines régulatrices** (AUF1, CBF-A, CUGBP2, HuR et hnRNP A0) sont susceptibles de se fixer à ce domaine ARE et de provoquer la dégradation rapide du messager et l'inhibition de sa traduction^{22,32,125,164,168}.

La demi-vie de la protéine COX-2 est comprise entre 13 et 50 minutes, cette isoforme est donc **très minoritaire dans les tissus normaux**. Elle est très rapidement dégradée par ubiquitination et par la voie du protéasome dans les cellules normales. Dans les cellules **tumorales**, sa durée de vie est **beaucoup plus importante** et comprise entre 3 et 8 heures. Au sein de ces cellules, la stabilité du messager est en effet favorisée par **les interleukines impliquées dans la réponse inflammatoire** (IL-1 α , IL-1 β et IL-17), **le TGF β , l'oncogène Ras et les produits de la COX-2** (PGE₂). Ces différents agents agissent en activant les voies de signalisation **p38, ERK/MAPK** ou la cascade **PI3K/PDK1/PKB**^{171,172} (figure 6).

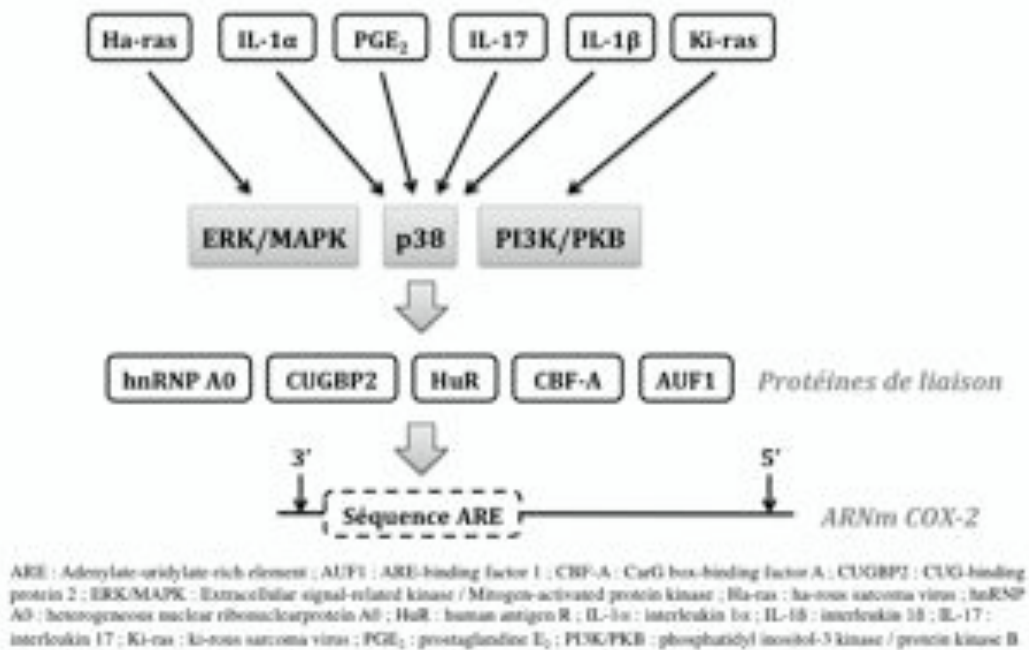


Figure 6 : Régulation post-transcriptionnelle de la COX-2 (adaptée de Rodrigues et al.¹⁶¹)

c. Localisation subcellulaire de la COX-2¹⁶¹

Au sein des cellules **non tumorales**, les deux isoformes de la COX se localisent sur la **face luminale du RE** et dans les **feuillettes internes et externes de l'enveloppe nucléaire**^{123,178}.

Dans les cancers prostatiques, en réponse au TNF- α , la COX-2 se distribue en foyers diffus non organisés **au sein du cytoplasme** des cellules prostatiques¹⁸³. La stimulation expérimentale de fibroblastes par le PMA ou l'IL-1 β induit également l'expression de la COX-2 et sa localisation au niveau de la **membrane plasmique**¹⁰⁴.

On a également mis en évidence la COX-2 dans les **mitochondries** et les **corps lipidiques** de cellules tumorales^{1,103}. La localisation intra-mitochondriale semble jouer un rôle important dans la **protection contre l'apoptose induite par le stress oxydatif** tandis que la localisation dans les corps lipidiques influence grandement la croissance tumorale en constituant **une unité intracellulaire supplémentaire** de production de prostaglandines.

La forte **mobilité** de la COX-2 consécutive à un stimulus permet de juxtaposer cette isoforme et les différentes prostaglandines synthases dans des territoires spécifiques et favorise ainsi **la mise en place d'une réponse adaptée à l'agression**.

3. La cyclo-oxygénase-3 (COX-3) ou cyclo-oxygénase-1b (COX-1b)

Une troisième isoforme, la COX-3, a été identifiée dans l'espèce canine mais son implication dans des contextes pathologiques dans cette espèce ou dans d'autres n'a pas encore été établie avec certitude. La plupart des données expérimentales semble conclure que cette nouvelle isoforme soit **le résultat d'un épissage alternatif des pré-ARN messagers issus du gène codant l'isoforme COX-1** et non le produit d'un troisième gène indépendant. À l'heure actuelle, aucune étude n'a confirmé l'activité cyclo-oxygénase de la COX-3 mise en évidence dans la publication originale de 2002¹⁸ ainsi que sa sensibilité au paracétamol.

II. CYCLO-OXYGENASE-2 ET CARCINOGENESE

La COX-2 joue un rôle clé dans **les phases précoces de la carcinogénèse** par différents mécanismes cellulaires et moléculaires incluant **la conversion de procarcinogènes en carcinogènes, la promotion de l'initiation tumorale, l'échappement à l'apoptose, l'immunosuppression, la promotion de l'angiogénèse tumorale, de l'invasion tumorale et de l'extension métastatique**¹⁶¹ (figure 7).

Les effets biologiques de la COX-2 dépendent de la **phase du cycle cellulaire** dans laquelle les cellules sont positionnées. En phase de quiescence **G0**, l'induction de la COX-2 permet la mise en place de la réponse inflammatoire, de l'angiogénèse et mécanismes de défense. L'expression de la COX-2 est initiée au cours de la transition G0/G1 et diminue progressivement au cours des phases G1, S, G2 et M après l'entrée dans le cycle cellulaire. En phase S, les cellules sont particulièrement soumises au **stress oxydatif** généré par l'activité de la COX-2, ce qui favorise les mutations et la carcinogénèse⁵². Ces mécanismes restent cependant complexes et sont pour le moment partiellement compris.

Dans l'espèce humaine, certaines études ont mis en évidence une expression de la **COX-1** dans les cancers ovariens^{34,56}. Bien que les informations soient peu nombreuses, elles suggèrent que cette isoforme pourrait, dans une certaine mesure, contribuer également à la carcinogénèse^{34,56}.

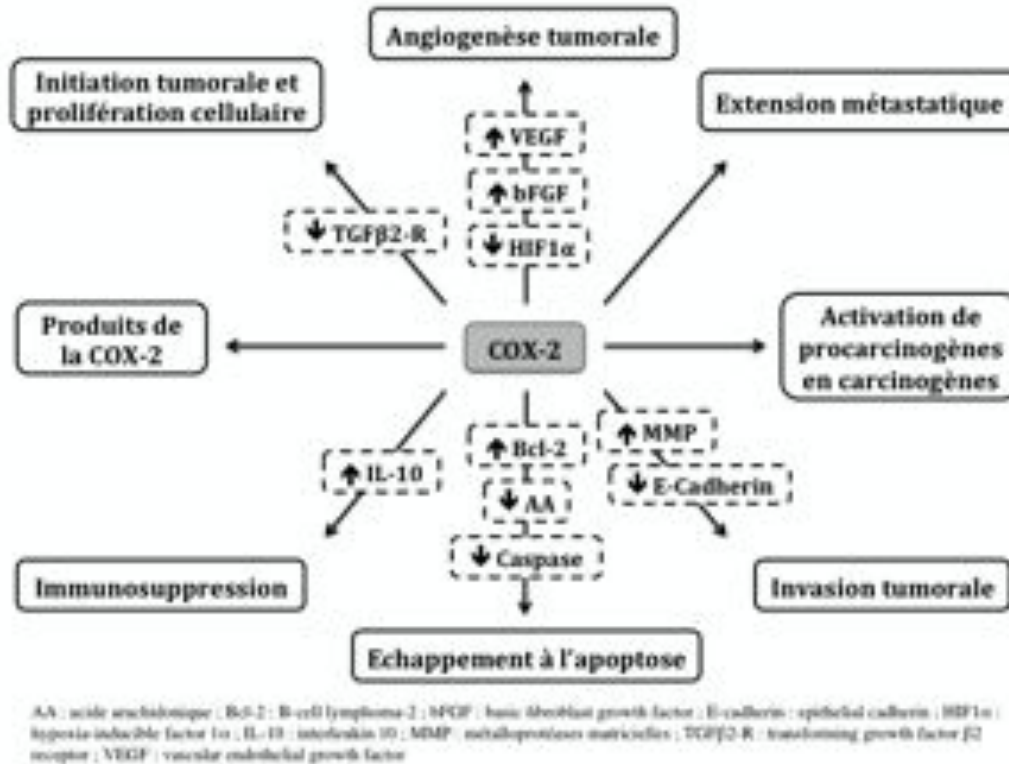


Figure 7 : Implication de la COX-2 dans la carcinogénèse (adaptée de Rodrigues et al.¹⁶¹)

A. La conversion de procarcinogènes en carcinogènes

Au cours du métabolisme de l'AA, la COX-2 libère des radicaux **hydroperoxydes** qui catalysent l'oxydation de nombreux xénobiotiques en **intermédiaires réactifs susceptibles de se lier à l'ADN**. Le **diéthylstilbestrol (DES)** est par exemple un dérivé d'oxydation des œstrogènes aux propriétés carcinogènes produit par l'activité de la COX-2²⁸.

En présence d'AA et d'hydroperoxydes, l'activité peroxydase de la COX-2 peut également **convertir des procarcinogènes**, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou les amines aromatiques, **en carcinogènes**. Cela a été montré, dans l'espèce humaine, pour le benzo[a]pyrène, un hydrocarbure aromatique polycyclique.

Certains produits de l'oxydation de l'AA tels que le **malonaldéhyde (MDA)** sont par ailleurs des espèces chimiques à **très forte réactivité** capables de former des **adduits à l'ADN**. La synthèse du MDA est étroitement liée à l'activité de la **TXA₂ synthase** qui transforme la moitié de la PGH₂ en TXA₂ et l'autre moitié en MDA. Le MDA est donc produit dans les tissus à **forte activité TXA₂ synthase** et forme avec les désoxyribonucléosides des **adduits** responsables de mutations. Dans l'espèce humaine, ces mutations sont fréquemment rencontrées au niveau du **gène p53** dans les cancers du côlon¹⁶⁹.

B. La promotion de l'initiation tumorale

Dans l'espèce humaine, parmi les études sur le rôle de la COX-2 dans la carcinogénèse, seuls Liu et al.¹⁰⁵ ont établi clairement un rôle de la COX-2 dans l'initiation tumorale. D'autres études expérimentales sur la carcinogénèse cutanée ont montré que la surexpression de la COX-2 est insuffisante pour initier la carcinogénèse mais qu'elle

sensibilise l'épiderme à l'effet des carcinogènes génotoxiques¹²⁶. Ces résultats suggèrent l'implication de la COX-2 dans **la promotion tumorale plutôt que dans l'initiation**.

C. L'échappement à l'apoptose

L'apoptose ou la **mort cellulaire programmée** est un mécanisme contrôlé d'élimination des cellules ayant subi des dégâts létaux et irréversibles. La réponse aux signaux apoptotiques est un mécanisme majeur de **protection** contre la carcinogenèse notamment à travers l'action de **gènes suppresseurs de tumeurs** tels que le **gène p53**.

D'une part, la COX-2 permet la survie cellulaire en induisant des **gènes anti-apoptotiques liés au NO et aux dérivés superoxydes** et en induisant des **protéines anti-apoptotiques** telles que **Bcl-2**¹⁹. D'autre part, elle diminue la quantité d'AA qui est un facteur **pro-apoptotique**. Son accumulation augmente en effet la conversion de sphingomyéline en céramide, un médiateur de l'apoptose¹⁷.

Dans les polypes et les adénomes colorectaux humains, la COX-2 favorise également la prolifération tumorale en diminuant l'expression du récepteur au TGFβ2 (**TGFβ2-R**) qui est un régulateur majeur de l'apoptose⁹¹.

Des études *in vitro* sur des cellules épithéliales intestinales ont montré que la surexpression de la COX-2 réduit la population de cellules en phase S du cycle cellulaire en favorisant l'accumulation de cellules en phase de transition G0/G1. Cette inhibition dans la progression du cycle cellulaire compromet **l'adhésion cellulaire** et confère des propriétés **d'échappement à l'apoptose**³⁶.

Ainsi, par différents procédés, la COX-2 prolonge la survie des cellules cancéreuses soumises au stress et aux radicaux libres et **favorise l'accumulation de mutations génétiques additionnelles, l'apparition d'un cancer et sa diversification vers des formes plus agressives** incluant les métastases et les résistances aux traitements anticancéreux.

D. L'immunosuppression

La croissance tumorale est associée à **l'invalidation de la réponse immunitaire**. Cet effet immunosuppresseur est consécutif l'activation de **monocytes** et de **macrophages** par le facteur CSF (Colony Stimulating Factor) libéré par les cellules tumorales. Les monocytes et les macrophages activés produisent de la **prostaglandine E₂** qui exerce son action en promouvant **l'invasion tumorale et l'extension métastatique** mais également en déprimant **le système immunitaire de l'hôte**^{54,55,62,193}. La **PGE₂** contribue notamment à réduire **l'activité ou la prolifération des médiateurs de l'inflammation** dépendants des prostaglandines : les lymphocytes B et T, les lymphokines, les cellules Natural Killer (NK), les cellules T cytotoxiques et les macrophages¹⁶¹. Expérimentalement, des niveaux élevés de PGE₂ engendrent une augmentation de la synthèse d'**IL-10**, une puissante cytokine **immunosuppressive**⁷⁹.

E. La promotion de l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale est une étape **précoce et essentielle** dans la croissance et l'extension métastatique d'un cancer^{60,206}. Toute augmentation de la masse tumorale doit en effet être **précédée d'une augmentation de la micro-vascularisation tumorale**. Celle-ci

permet un apport suffisant en **oxygène** et en **nutriments** et une **élimination correcte des déchets métaboliques**. En l'absence de cette capacité à recruter de nouveaux vaisseaux sanguins, la plupart des tumeurs n'atteindraient pas une taille supérieure à 1 ou 2 millimètres de diamètre et ne pourraient métastaser²⁰⁶. L'angiogenèse, qui se définit comme **la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants**¹⁵⁶, est un processus finement régulé par les variations d'un équilibre local entre des facteurs angiogéniques positifs et négatifs.

Des résultats expérimentaux ont montré que les deux isoformes de la COX régulent l'angiogenèse tumorale selon des mécanismes **différents**¹⁹³. La COX-2 induit la production de **facteurs pro-angiogéniques** tels que **le VEGF, le bFGF ou le PDGF** tandis que la COX-1 régule l'angiogenèse au niveau des cellules endothéliales par un effet **morphogène**. Parmi les facteurs pro-angiogéniques, le VEGF est **le plus efficace et le plus largement distribué**⁴¹. Il stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales et prévient la régression des vaisseaux sanguins néoformés. Dans l'espèce humaine, l'association entre la surexpression de la COX-2, l'augmentation de la production du VEGF et de la densité microvasculaire intra-tumorale a été montrée dans plusieurs types tumoraux^{16,49,92,115,205,208}.

Des résultats similaires ont été obtenus dans les **tumeurs mammaires félines** par Millanta et al.¹¹⁷. Dans les **tumeurs mammaires canines**, ces mêmes auteurs n'ont pas mis en évidence cette association bien que certaines études aient montré que l'expression du VEGF était corrélée à **un potentiel métastatique supérieur et à une durée de vie plus courte**^{117,149,155}.

La COX-2 est également impliquée dans l'angiogenèse tumorale à travers la production de **PGE₂, de TXA₂ et de PGI₂**, trois prostanoïdes issus du métabolisme de l'AA. La **PGE₂** est en effet connue pour induire la synthèse d'**IL-6** et d'**haptoglobine**, deux médiateurs clés dans l'angiogenèse, l'invasion tumorale et l'extension métastatique⁴⁴.

F. La promotion de l'invasion tumorale et de l'extension métastatique

L'invasion tumorale et l'extension métastatique d'un cancer sont les aspects les plus insidieux et péjoratifs en matière de pronostic. La **dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et la mobilité cellulaire** sont essentielles à ces deux processus. Les **métalloprotéases matricielles (MMPs)** forment une famille d'enzymes **protéolytiques** impliquées dans la dégradation de la MEC dont l'expression peut être induite par la COX-2. Dans les cancers colorectaux humains, le niveau d'expression des MMPs est corrélé à l'invasion tumorale de la membrane basale et du stroma, à la pénétration vasculaire et au potentiel métastatique¹⁹².

L'acquisition du pouvoir invasif par les cellules tumorales constitue un événement clé dans la progression des tumeurs solides. Dans l'espèce humaine, on a pu démontrer en conditions *in vitro* que la surexpression de la COX-2 altère le **phénotype** des cellules intestinales épithéliales, ce qui pourrait augmenter leur agressivité. On a également pu montrer que la **COX-2** augmente **l'adhésion des cellules tumorales** :

- à la **matrice extracellulaire**, en diminuant l'expression des **E-cadhérines**, codées par un gène suppresseur de tumeurs impliqué dans les contacts intercellulaires¹⁹¹
- aux **cellules endothéliales**, *via* les **E-sélectines**, favorisant ainsi le passage des cellules tumorales vers la circulation sanguine et donc l'extension métastatique⁷⁸

Les **produits de la COX-2** sont également impliqués dans l'invasion tumorale et l'extension métastatique. En effet, les mécanismes d'adhésion, de migration et d'invasion cellulaires sont régulés par la **PGE₂** et pourraient impliquer la phosphorylation rapide de l'EGFR et l'activation de la voie ERK2¹³⁸. La **TXA₂** induit également la migration des **cellules endothéliales** via les récepteurs TPα et TPβ couplés aux protéines G¹³¹.

III. EXPRESSION DE LA COX-2 ET TUMEURS CANINES

A. Les carcinomes à cellules transitionnelles

De nombreux résultats obtenus dans l'espèce canine et humaine amènent à penser que la COX-2 joue un rôle important dans le développement des carcinomes à cellules transitionnelles. L'animal pourrait donc constituer un **modèle d'étude** unique. Dans l'espèce canine, les carcinomes à cellules transitionnelles sont les tumeurs les plus **fréquentes** de la **vessie**. L'expression de la COX-2 par l'épithélium tumoral est rapportée dans la majorité (**58 à 100%**)^{83,89,90,99,121} des carcinomes à cellules transitionnelles canins (tableau 2).

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
Carcinomes à cellules transitionnelles	21	100	IHC	Khan et al. 2000
	18	100	IHC	Knottenbelt et al. 2006
	18	100	IHC	Mutsaers et al. 2005
	52	58	IHC	Lee et al. 2007

IHC : immunohistochimie

Tableau 2 : Expression de la COX-2 et carcinomes à cellules transitionnelles canins

B. Les tumeurs mammaires

Les tumeurs mammaires sont les tumeurs les plus **fréquentes** chez la chienne. Les tumeurs **malignes** représentent approximativement **50%** des tumeurs mammaires. Ces tumeurs sont **hormono-dépendantes** et une ovariectomie **avant les premières chaleurs** a montré un effet protecteur **majeur**¹²⁴.

L'expression de la COX-2 dans les tumeurs mammaires canines a été rapportée pour la première fois en 2003 avec une **augmentation plus marquée** de l'expression de la COX-2 dans **les tumeurs malignes** comparativement aux tumeurs bénignes³⁵. Cette étude a également montré que la COX-2 était exprimée par **56%** des adénocarcinomes mammaires³⁵. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs études qui ont montré un taux d'expression tumorale de la COX-2 plus faible (42%)³⁰, similaire (56%)⁶⁴ ou supérieur (62 à 100%)^{5,26,27,98,117,120,150,152,153} (tableau 3).

Dans l'espèce canine, selon les études, le tissu mammaire non tumoral semble exprimer légèrement la COX-2 ou ne pas l'exprimer. Une étude récente a montré que cette expression, lorsqu'elle était présente, se localisait au niveau de la **membrane apicale** alors qu'elle se localisait dans le **cytoplasme** ou à proximité de la **membrane nucléaire** dans les cellules épithéliales tumorales³⁰.

Certaines études ont montré que **des types de carcinomes mammaires** expriment la COX-2 à des niveaux supérieurs tels que les carcinomes tubulo-papillaires, anaplasiques, inflammatoires, épidermoïdes et les carcinosarcomes^{26,64,150,151}.

Le terme de **carcinome inflammatoire** fait référence à une présentation clinique spécifique qui se caractérise par une lésion rare, très agressive localement, à fort potentiel métastatique et une mauvaise réponse thérapeutique¹⁴¹.

Des travaux plus récents ont également montré que, dans les tumeurs mammaires, la majorité (**10/12**) des **sites métastatiques** semble exprimer la COX-2³⁰. Ces auteurs ont également mis en évidence, au niveau de ces sites, une intensité du marquage **similaire voire supérieure** à celle observée au niveau de la tumeur primitive.

Une étude a montré que l'expression de la COX-2 était corrélée à une surexpression de la **protéine Her-2** et à un **type histologique moins différencié**¹¹⁷. Ces résultats sont à mettre en relation avec les études qui ont montré que l'**association** des inhibiteurs de la COX-2 et des **inhibiteurs de la Her-2** était bénéfique¹⁰⁸. On a également montré que la surexpression de la COX-2 était corrélée à un **index mitotique élevé et à une surexpression de la protéine p53**⁵. Ces résultats sont conformes aux hypothèses émises sur l'implication des oncogènes Her-2/neu et p53 dans le rôle de la COX-2 dans la carcinogenèse.

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
<i>Tumeurs mammaires malignes</i>	39	100	IHC	Queiroga et al. 2007
	27	100	IHC	Queiroga et al. 2010a
	42	76	IHC	Queiroga et al. 2010b
	23	74	IHC	Nowak et al. 2005
	28	57	IHC	de Nardi et al. 2005
	84	56	IHC	Doré et al. 2003
	119	45	IHC	Badowska et al. 2010
	45	42	IHC	Dias Pereira et al. 2009
<i>Tumeurs mammaires bénignes</i>	21	100	IHC	Queiroga et al. 2007
	14	93	IHC	Badowska et al. 2010
	20	35	IHC	de Nardi et al. 2005
	63	24	IHC	Doré et al. 2003
	36	8	IHC	Dias Pereira et al. 2009
	28	7	IHC	Queiroga et al. 2010b
<i>Carcinomes mammaires inflammatoires</i>	12	100	IHC	de M. Souza et al. 2009
	28	100	IHC	Millanta et al. 2006
<i>Carcinomes mammaires</i>	46	100	IHC	Lavalle et al. 2009
	13	62	IHC	Mohammed et al. 2004
	50	56	IHC	Heller et al. 2005a

IHC : immunohistochimie

Tableau 3 : Expression de la COX-2 et tumeurs mammaires canines

C. Les carcinomes épidermoïdes

Dans l'espèce canine, les carcinomes épidermoïdes sont les tumeurs cutanées et les tumeurs malignes de la cavité orale les plus **fréquentes**^{48,196}. Les carcinomes épidermoïdes cutanés sont **localement invasifs** et se localisent préférentiellement au niveau des **membres**, de la **tête** et de l'**abdomen**.⁹³

L'expression de la COX-2 a été mise en évidence dans la majorité (**65 à 100%**)^{71,7,142,144} des carcinomes épidermoïdes que leur localisation soit **orale, cutanée** ou **unguéale** (tableau 4). Dans ces études, le marquage anti-COX-2 le plus **intense** a été observé dans les **kératinocytes tumoraux**^{142,144}.

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
<i>Carcinomes épidermoïdes</i>	40	100	IHC, WB	Pestili de Almeida et al. 2001
<i>Carcinomes épidermoïdes cutanés</i>	10	100	IHC	Poggiani et al. 2012
	9	100	IHC	Bardagi et al. 2011
<i>Carcinomes épidermoïdes oraux</i>	26	65	IHC	Mohammed et al. 2004

IHC : immunohistochimie ; WB : Western blot

Tableau 4 : Expression de la COX-2 et carcinomes épidermoïdes canins

D. Les tumeurs mélanocytaires

Les tumeurs mélanocytaires représentent **4 à 20%** des tumeurs cutanées canines et se localisent principalement au niveau de la **tête**, de l'**abdomen ventral** et du **scrotum**. Les tumeurs mélanocytaires de la **cavité orale** sont presque toujours **malignes** et sont les cancers oraux les plus fréquents¹⁷⁴. L'expression de la COX-2 a été mise en évidence dans la plupart (**37 à 92%**)^{110,120,137,143} des tumeurs mélanocytaires canines que leur localisation soit **orale, cutanée** ou **oculaire** (tableau 5).

Une seule étude a montré l'absence d'expression de la COX-2 dans les tumeurs mélanocytaires **bénignes**¹⁴³. Des résultats similaires ont été obtenus dans l'espèce humaine^{20,167} et suggèrent que la COX-2 est impliquée dans la **transformation tumorale des mélanocytes**. Paglia et al.¹³⁷ ont cependant montré que la **localisation** et l'**intensité** de l'expression de la COX-2 dans les globes oculaires atteints de tumeurs mélanocytaires de l'uvéa étaient **identiques** à celles identifiées dans les globes oculaires sains ou atteints de maladies non tumorales.

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
<i>Mélanomes oraux</i>	25	92	IHC	Martinez et al. 2011
<i>Mélanomes cutanés</i>	32	53		
<i>Mélanomes oraux</i>	9	100	IHC	Pires et al. 2010
<i>Mélanomes oculaires</i>	2	50		
<i>Mélanomes cutanés</i>	20	55		
<i>Mélanocytomes cutanés</i>	9	0		
<i>Mélanomes oraux</i>	15	60	IHC	Mohammed et al. 2004
<i>Tumeurs mélanocytaires de l'uvéa</i>	57	37	IHC	Paglia et al. 2009

IHC : immunohistochimie

Tableau 5 : Expression de la COX-2 et tumeurs mélanocytaires canines

E. Les tumeurs prostatiques

Les carcinomes prostatiques sont le plus souvent diagnostiqués chez le **vieux chien mâle castré** et sont de **mauvais pronostic**. Les traitements chirurgicaux ou de radiothérapie sont rarement pratiqués en raison des complications et des risques élevés de **métastases**¹⁷⁶.

La surexpression de la COX-2 dans les carcinomes prostatiques canins fut mise en évidence pour la première fois en 1999¹⁸⁹. Cette étude a montré que la COX-2 était absente des prostates saines mais qu'elle était exprimée par les **cellules épithéliales tumorales** dans la plupart des adénocarcinomes prostatiques (**75%**). Des travaux plus récents ont confirmé l'expression de la COX-2 dans la majorité des carcinomes prostatiques canins (**56 à 100%**)^{95,120,176,189} (tableau 6).

Contrairement à ce qui a été montré dans l'espèce humaine, l'expression de la COX-2 ne semble pas varier avec le degré de **différenciation tumorale** dans l'espèce canine et des niveaux plus faibles d'expression semblent être associés à la présence d'**infiltrations inflammatoires**⁹⁵.

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
<i>Carcinomes prostatiques</i>	5	100	IHC	Rodrigues et al. 2010
	34	88	IHC	Sorenmo et al. 2004
	48	86	IHC, WB	L'Eplattenier et al. 2007
	9	56	IHC	Mohammed et al. 2004
<i>Adénocarcinomes prostatiques</i>	24	75	IHC, WB	Tremblay et al. 1999

IHC : immunohistochimie ; WB : Western blot

Tableau 6 : Expression de la COX-2 et tumeurs prostatiques canines

F. Les tumeurs nasales épithéliales

Dans l'espèce canine, les tumeurs nasales épithéliales représentent environ **60 à 75%** des tumeurs intranasales **malignes**¹³⁶. Quatre études ont mis en évidence que la majorité (**71 à 90%**)^{8,10,71,87} des tumeurs nasales épithéliales canines exprime la COX-2 parmi lesquelles des carcinomes papillaires et anaplasiques, des adénocarcinomes, des carcinomes épidermoïdes et des carcinomes à cellules transitionnelles^{8,10,71,87} (tableau 7).

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
<i>Tumeurs nasales épithéliales</i>	42	90	IHC	Belshaw et al. 2010
	15	87	IHC	Borzacchiello et al. 2004
	21	81	IHC	Kleiter et al. 2004
	24	71	IHC	Impellizeri et al. 2008

IHC : immunohistochimie

Tableau 7 : Expression de la COX-2 et tumeurs nasales épithéliales canines

G. Les ostéosarcomes

Dans l'espèce canine et humaine, les ostéosarcomes constituent les tumeurs osseuses primaires **malignes** les plus **fréquentes**. Le comportement biologique des ostéosarcomes se caractérise par une **agressivité** sur le plan **local et systémique** dans les deux espèces.

Les données les plus récentes semblent indiquer que la majorité (**77 à 93%**)^{116,127} des ostéosarcomes canins exprime la COX-2 conformément aux résultats obtenus dans l'espèce humaine³¹ (tableau 8). Millanta et al.¹¹⁶ ont également montré que l'expression de la COX-2 était corrélée à l'**expression de l'isomérase mPGES-1 et du récepteur EP₂ à la PGE₂**.

La dérégulation de la voie métabolique **COX-2/PGE₂/EP₂** semble donc être associée à la progression tumorale dans les ostéosarcomes canins.

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
<i>Ostéosarcomes appendiculaires</i>	27	93	IHC	Millanta et al. 2012
	44	77	IHC, WB	Mullins et al. 2004
<i>Ostéosarcomes</i>	13	23	IHC	Mohammed et al. 2004

IHC : immunohistochimie ; WB : Western blot

Tableau 8 : Expression de la COX-2 et ostéosarcomes canins

H. Les tumeurs digestives

Bien que, dans l'espèce humaine, le rôle de la COX-2 soit clairement identifié dans les tumeurs digestives¹⁷³, son implication semble **beaucoup moins évidente** dans l'espèce canine dans des types tumoraux équivalents. Les tumeurs épithéliales du tube digestif sont par ailleurs beaucoup **moins fréquentes** dans l'espèce canine.

McEntee et al.¹¹³ ont montré que la plupart (**47%**) des **adénocarcinomes** digestifs, colorectaux et intestinaux, exprime la COX-2 au niveau de l'**épithélium tumoral** mais le plus souvent avec un pourcentage **faible** de cellules marquées (5 à 10%) (tableau 9). Dans cette étude, l'expression de la COX-2 a également été mise en évidence dans la majorité (65%) des **adénomes** colorectaux au niveau du **stroma non tumoral** et non au niveau de l'épithélium tumoral. Knottenbelt et al.⁹⁰ ont par ailleurs mis en évidence des niveaux **faibles** d'expression de la COX-2 dans **38%** des adénocarcinomes colorectaux (tableau 9).

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
<i>Adénomes colorectaux</i>	20	65		
<i>Adénocarcinomes colorectaux et intestinaux</i>	15	47	IHC, WB	McEntee et al. 2002
<i>Adénocarcinomes colorectaux</i>	21	43	IHC	Knottenbelt et al. 2006

IHC : immunohistochimie ; WB : Western blot

Tableau 9 : Expression de la COX-2 et tumeurs digestives canines

I. Les mastocytomes

Les mastocytomes sont relativement fréquents dans l'espèce canine et représentent **7 à 21%** des tumeurs cutanées. Leur comportement biologique est très **variable**, d'une masse bénigne isolée à une forme systémique potentiellement létale¹⁹⁹. Les études les plus récentes suggèrent que la majorité (**64 à 95%**)^{145,195} des mastocytomes exprime la COX-2 (tableau 10).

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
<i>Mastocytomes (grade I)</i>	14	64		
<i>Mastocytomes (grade II)</i>	19	89	IHC	Prada et al. 2012
<i>Mastocytomes (grade III)</i>	16	95		
<i>Mastocytomes</i>	53	78	IHC	Vascellari et al. 2013
<i>Mastocytomes (grade II)</i>	17	6	IHC	Heller et al. 2005b

IHC : immunohistochimie

Tableau 10 : Expression de la COX-2 et mastocytomes canins

J. Les autres tumeurs canines exprimant la COX-2

Dans l'espèce canine, l'expression de la COX-2 a été rapportée dans d'autres types tumoraux qui sont les **carcinomes rénaux**⁸⁴ et **ovariens**¹¹, les **fibrosarcomes des tissus mous**¹³³ et les **méningiomes**¹⁶³ (tableau 11). Une étude restreinte sur les carcinomes rénaux a en effet montré une expression de la COX-2 dans **2 cas sur 3**⁸⁴. Une étude sur les carcinomes ovariens a montré une expression de la COX-2 dans **9 cas sur 11** avec une intensité **variable** du marquage¹¹. Nowak et al.¹³³ ont montré une expression de la COX-2 dans **43%** des fibrosarcomes des tissus mous avec une intensité de marquage **faible** (30% des cas) à **modérée** (13% des cas). Rossmeisl et al.¹⁶³ ont mis en évidence une expression de la COX-2 dans **88%** des méningiomes avec une intensité de marquage **très variable** et une **faible** proportion de cellules marquées (1 à 50% des cellules marquées dans 83% des cas).

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
<i>Méningiomes</i>	24	88	IHC, WB	Rossmeisl et al. 2009
<i>Carcinomes ovariens</i>	11	82	IHC	Borzacchiello et al. 2007
<i>Carcinomes rénaux</i>	3	67	IHC	Khan et al. 2001
<i>Fibrosarcomes des tissus mous</i>	23	43	IHC	Nowak et al. 2007

IHC : immunohistochimie ; WB : Western blot

Tableau 11 : Les autres tumeurs canines exprimant la COX-2

K. Les tumeurs canines n'exprimant pas ou rarement la COX-2

Dans l'espèce canine, les études publiées semblent indiquer que les **sarcomes histiocytaires**⁶³, les **fibrosarcomes oraux**¹²⁰, les **gliomes**⁷⁴, les **hémangiosarcomes**⁶³ et les **lymphomes**^{120,159} expriment rarement ou n'expriment pas la COX-2 (tableau 12).

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude
<i>Sarcomes histiocytaires</i>	20	5	IHC	Heller et al. 2005b
<i>Fibrosarcomes oraux</i>	5	0	IHC	Mohammed et al. 2004
<i>Gliomes</i>	20	0	IHC	Jankovsky et al. 2013
<i>Hémangiosarcomes</i>	19	0	IHC	Heller et al. 2005b
<i>Lymphomes</i>	12	0	IHC	Rodrigues et al. 2011
	10	0	IHC	Mohammed et al. 2004

IHC : immunohistochimie

Tableau 12 : Les tumeurs canines n'exprimant pas ou rarement la COX-2

IV. LIMITES DES ETUDES SUR L'EXPRESSION TUMORALE DE LA COX-2

La **grande variabilité** des résultats obtenus, au sein de l'espèce canine, sur l'expression de la COX-2 pour un même type tumoral nous amène à étudier les **différentes méthodes** qui permettent de mettre en évidence l'expression de la COX-2 et leurs limites. Leur comparaison nous permettra, dans un second temps, de choisir une méthode standardisée dont la mise en place sera validée au sein du Laboratoire d'Anatomie pathologique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT).

Au sein des études rapportées précédemment, **trois méthodes** ont été utilisées afin de mettre en évidence l'expression tumorale de la COX-2 : le **Western blot (WB)**, le **dosage immuno-enzymatique (EIA)** et l'**immunohistochimie (IHC)**.

A. Le Western blot

En conditions *in vitro*, le Western blot est une technique qui semble **plus sensible** que l'immunohistochimie pour mettre en évidence l'expression de la COX-2⁶⁵. Elle permet de déterminer **la nature de l'isoforme** de la COX exprimée d'après son **poids moléculaire**. Cette technique reste cependant le plus souvent utilisée pour étudier l'expression de la COX-2 au sein de **cultures cellulaires**. Parmi les études sur l'expression de la COX-2 dans des prélèvements tumoraux (tableau 13), le Western blot a été utilisé comme un **contrôle positif** et non afin de caractériser l'expression de la COX-2. Cette technique permet en effet de tester la **spécificité de l'anticorps primaire** dirigé contre l'épitope de la COX-2 utilisé en immunohistochimie et de vérifier l'absence de **réactivité croisée**^{95,113,127,142,163,189}. Le Western blot constitue donc une méthode **complémentaire** de l'immunohistochimie mais qui ne peut généralement pas s'y substituer. On notera que 6 études sur 42 ont eu recours à cette méthode.

	Type tumoral	(N)	Méthode	Etude
Tumeurs épithéliales	Carcinomes prostatiques	48	IHC, WB	L'Eplattenier et al. 2007
	Adénocarcinomes prostatiques	24	IHC, WB	Tremblay et al. 1999
	Carcinomes épidermoïdes	40	IHC, WB	Pestili de Almeida et al. 2001
	Tumeurs colorectales	35	IHC, WB	McEntee et al. 2002
Tumeurs mésoenchymateuses	Ostéosarcomes	44	IHC, WB	Mullins et al. 2004
	Méningiomes	24	IHC, WB	Rossmesl et al. 2009

IHC : immunohistochimie ; WB : Western blot

Tableau 13 : Mise en évidence de l'expression de la COX-2 par IHC et Western blot

B. Le dosage immuno-enzymatique

Cette méthode est rapportée dans une étude parmi les 42 citées précédemment. Elle fut adoptée par Queiroga et al.¹⁵¹ pour mettre en évidence l'expression de la COX-2 dans des tissus mammaires. Cette technique a pour avantage de fournir un résultat pour un homogénat composé d'une **quantité fixe** de tissu mammaire (0,5 g) et de PBS (4 mL). Elle est donc parfaitement **reproductible** mais ne permet pas de caractériser avec précision l'expression de la COX-2 par les cellules tumorales.

C. L'immunohistochimie

Contrairement aux deux méthodes déjà présentées, l'immunohistochimie (IHC) permet de déterminer la **proportion de cellules tumorales** exprimant la COX-2, la **distribution de son expression** au sein du prélèvement tumoral, sa **localisation cellulaire**, cytoplasmique ou nucléaire, et **son intensité**. Elle permet notamment de distinguer l'expression de la COX-2 par les cellules tumorales de son expression par les cellules **non tumorales**. C'est pourquoi l'IHC a été la méthode qui a été retenue dans le cadre de cette étude préliminaire.

Bien que l'IHC soit la méthode la plus couramment utilisée afin de mettre en évidence l'expression tumorale de la COX-2, on note une **méthodologie très variable** d'une étude à l'autre. Ces variations concernent aussi bien les **différentes étapes de la technique immunohistochimique** que **l'interprétation du marquage anti-COX-2 obtenu**.

1. Variabilité de la technique immunohistochimique

Concernant la technique immunohistochimique, on rapporte des variations au niveau de la **nature** et de la **dilution de l'anticorps primaire**, des techniques de **démasquage antigénique** et des méthodes **d'amplification et de révélation**.

a. La nature et la dilution de l'anticorps primaire

Des anticorps **monoclonaux** et **polyclonaux** ont été utilisés alors qu'ils pouvaient être dirigés contre une **protéine COX-2 différente, humaine ou animale** (tableau 14). Ces anticorps ont été obtenus expérimentalement à partir d'espèces différentes (tableau 14). **Trois espèces hôtes** ont été rapportées dans les études citées précédemment : la souris, le rat et la chèvre. La **dilution** à laquelle était appliquée l'anticorps primaire était également très variable d'une étude à l'autre (tableau 14).

C'est pourquoi la plupart des études ont eu recours à des **contrôles positifs et négatifs** afin de vérifier la **spécificité** du marquage immunohistochimique obtenu. Le Western blot a ainsi été utilisé dans six études comme cela a déjà été mentionné^{93,106,107,114,117,124}. Dans la majorité des études, ce sont des prélèvements de **rein canin** qui ont été utilisés comme contrôle positif de l'expression de la COX-2^{78,83,95,102,103,108,109,111,112,114,119-121,125,126}. Des études ont effet montré que les **cellules rénales canines de la macula densa** et de la **branche ascendante de l'anse de Henlé** exprimaient de manière constitutive la COX-2 à des niveaux faibles^{85,200}. Des prélèvements obtenus chez l'homme à partir de **carcinomes colorectaux**^{30,98} ou de **tumeurs du sein**^{116,117} et chez le chien à partir de **carcinomes à cellules transitionnelles**^{90,95} ou de **carcinomes mammaires**^{159,163} ont été parfois utilisés comme contrôle positif. Ce sont en effet des types tumoraux pour lesquels une expression de la COX-2 a été rapportée à plusieurs reprises.

Les contrôles négatifs ont été le plus souvent réalisés par **omission** en remplaçant l'anticorps primaire par du PBS. Un **anticorps d'isotype identique** à celui de l'anticorps primaire a parfois été utilisé dans certaines études^{113,116,117,120}.

Anticorps	Immunogène	Référence	Source	Dilution	Etude
<i>monoclonal de souris anti-COX-2 humaine</i>	aa 580-598	Clone CX-294	Dako Corporate	NS	Poggiani et al. 2012
				1:100	Badowska et al. 2010
				1:50	Rodrigues et al. 2010 Martinez et al. 2011
<i>monoclonal de souris anti-COX-2 humaine</i>	NS	COX 229	Zymed Laboratories	1:50	L'Eplattenier et al. 2007
<i>monoclonal de lapin anti-COX-2 humaine</i>	extrémité C-terminale	Clone SP21	Lab Vision/Neomarkers	1:75	Dias Pereira et al. 2009
				1:50	Prada et al. 2012
				1:20	Vascelleri et al. 2013 Lavalle et al. 2009
<i>monoclonal de souris anti-COX-2 murine</i>	aa 368-604	Clone 33	BD Transduction Laboratories	1:40	McEntee et al. 2002 Queiroga et al. 2007 Pires et al. 2010 Queiroga et al. 2010a Queiroga et al. 2010b
				NS	Nowak et al. 2005
				1:100	Nowak et al. 2007
				1:50	Millanta et al. 2012
				NS	Bardagi et al. 2011
<i>polyclonal de chèvre anti-COX-2 murine</i>	extrémité C-terminale	Clone M-19	Santa Cruz Biotechnology	1:8000	McEntee et al. 2002
				1:500	Mullins et al. 2004
				1:250	Belshaw et al. 2010
				1:200	Knottenbelt et al. 2006 Borzacchiello et al. 2004 Borzacchiello et al. 2007
				1:7500	Tremblay et al. 1999 Doré et al. 2003 Pestilli de Almeida et al. 2001
				NS	de Nardi et al. 2005
<i>polyclonal de lapin anti-COX-2 humaine</i>	NS	PG27b	Oxford Biomedical Research	1:500	Mohammed et al. 2004 de M. Souza et al. 2009
				1:250	Sorenmo et al. 2004
				1:150	Heller et al. 2005a Heller et al. 2005b Rossmeisl et al. 2009
				1:100	Khan et al. 2000 Khan et al. 2001 Mutsaers et al. 2005
				1:40	Kleiter et al. 2004 Lee et al. 2007
				1:300	Impellizeri et al. 2008

aa : acide aminé ; NS : non spécifié

Tableau 14 : Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie (adapté de Doré et al.³³)

b. Le démasquage antigénique

Le démasquage antigénique a pour objectif de rompre les liaisons moléculaires qui se sont créées au cours de la **fixation** et qui modifient la configuration spatiale des épitopes. Le démasquage antigénique assure ainsi une **meilleure accessibilité des épitopes à l'anticorps primaire**. Cette étape de démasquage antigénique n'est pas **systématiquement** réalisée.

Lorsqu'elle est présente, une **solution de citrate à 10 mmol.L⁻¹ (mM) tamponnée à pH 6** est généralement appliquée pendant une durée variable de 30 secondes à 30 minutes. Ce tampon est le plus souvent associé à un **traitement thermique au four à micro-ondes** (180 à 750 W pendant 5 à 20 minutes) ou au **bain-marie** (10 à 30 minutes à 95°C).

c. La méthode d'amplification et de révélation

Dans 16 études sur 42, la méthode d'amplification et de révélation utilisée était une méthode de **marquage enzymatique** dénommée **streptavidine-biotine-peroxydase**. Cette méthode dite à **trois couches** permet d'améliorer la **sensibilité** de la technique immunohistochimique (tableau 15).

1 : fixation de l'anticorps primaire sur l'épitope de la COX-2
2 : fixation de l'anticorps secondaire porteur d'une molécule de biotine sur l'anticorps primaire
3 : fixation du complexe streptavidine-peroxydase sur la molécule de biotine portée par l'anticorps secondaire

Tableau 15 : Méthode de marquage enzymatique streptavidine-biotine-peroxydase

Plus rarement, d'autres méthodes de marquage enzymatique sont rapportées : la méthode **avidine-biotine-peroxydase**^{30,137}, la méthode **avidine-biotine-complex**^{95,116,142,189}, la méthode **peroxydase-antiperoxydase**¹¹⁰ et la méthode **d'amplification du signal à la tyramide**¹²⁰. L'**immunofluorescence indirecte** a été adoptée par Borzacchiello et al.¹⁰ pour mettre en évidence l'expression de la COX-2 et de la COX-1 dans les carcinomes nasaux canins. Dans cette étude, les résultats obtenus par immunofluorescence étaient **similaires** à ceux obtenus en immunohistochimie par marquage enzymatique.

Dans 29 études sur 42, le **chromogène** utilisé pour réaliser l'étape de **révélation** était la **3,3'-diaminobenzidine tétrachloride** (DAB). On note dans trois études l'utilisation d'**Amino-Ethyl-Carbazole** (AEC)^{110,120,137}.

2. Variabilité de l'évaluation du marquage immunohistochimique anti-COX-2

Concernant l'évaluation du marquage anti-COX-2 obtenu par immunohistochimie, on observe des variations au niveau de l'évaluation de la **proportion** de cellules tumorales marquées et de l'**intensité** du marquage des cellules tumorales. Les études citées précédemment font en effet appel à **différentes** échelles de notation **semi-quantitatives**.

a. L'évaluation de la proportion de cellules tumorales exprimant la COX-2

La **proportion** de cellules tumorales marquées est évaluée le plus souvent à l'aide d'une échelle à **cinq niveaux** dont les bornes varient d'une étude à l'autre et dont le nombre peut aller de 3 à 6 (tableau 16). Chaque niveau est associé à un **score** compris entre **0 et 5**. Bien que les deux premières échelles aient été utilisées dans 12 études, aucune échelle ne semble pour le moment être privilégiée dans l'évaluation de la proportion de cellules tumorales marquées (tableau 16).

Score	0	1	2	3	4	5	Etudes (N)
proportion de cellules tumorales marquées	0	1 - 10%	11 - 50%	51 - 80%	81 - 100%		7
	0	1 - 9%	10 - 30%	31 - 60%	61 - 100%		5
	< 25%	25 - 50%	51 - 75%	76 - 100%			2
	< 10%	10 - 30%	31 - 100%				1
	< 5%	5 - 25%	26 - 50%	51 - 75%	76 - 100%		1
	< 5%	5 - 25%	25 - 50%	51 - 100%			1
	0	1 - 29%	30 - 60%	61 - 100%			1
	0	1 - 19%	20 - 49%	51 - 100%			1
	0	1 - 19%	20 - 40%	41 - 60%	61 - 80%	81 - 100%	1
	0	1 - 10%	11 - 50%	51 - 100%			1
	0	< 5%	6 - 20%	21 - 50%	51 - 100%		1
	0	< 1%	1 - 4%	5 - 10%	11 - 100%		1
	0	< 1%	1 - 10%	11 - 50%	51 - 100%		1
		0	1 - 9%	10 - 50%	51 - 100%		1

Tableau 16 : Evaluation de la proportion de cellules tumorales exprimant la COX-2

b. L'évaluation de l'intensité du marquage immunohistochimique anti-COX-2

L'**intensité** du marquage des cellules tumorales est évaluée le plus souvent à l'aide d'une échelle à **quatre niveaux** dont les caractéristiques varient d'une étude à l'autre et dont le nombre peut aller de 4 à 5 (tableau 17). Chaque niveau est associé à un **score** compris entre **0 et 4**. 31 études ont adopté une évaluation **similaire** de l'intensité du marquage anti-COX-2.

Score	0	1	2	3	4	Etudes (N)
intensité du marquage des cellules tumorales	<i>absent</i>	<i>faible</i>	<i>modéré</i>	<i>fort</i>		31
	<i>absent</i>	<i>équivoque</i>	<i>modéré à intense</i>	<i>le plus fort</i>		1
	<i>absent</i>	<i>faible</i>	<i>léger</i>	<i>modéré</i>	<i>fort</i>	1

Tableau 17 : Evaluation de l'intensité du marquage immunohistochimique anti-COX-2

c. L'évaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2

Bien que l'expression tumorale de la COX-2 soit définie le plus souvent par la mise en évidence d'un **marquage cytoplasmique brun net dans les cellules tumorales**, certains auteurs considèrent que seules les tumeurs dont le **score immunohistochimique est supérieur ou égal à 2** expriment réellement la COX-2^{8,87,99}. Dans 20 études sur 42, ce score a été obtenu en multipliant le score de la proportion de cellules tumorales marquées par celui de l'intensité du marquage. Le score immunohistochimique est évalué à l'aide d'une échelle à **quatre niveaux** dont les bornes varient d'une étude à l'autre^{127,132,133,177} (tableau 18). Il permet d'apprécier l'**immunoréactivité tumorale anti-COX-2** et est généralement considéré **élevé** lorsqu'il est **supérieur ou égal à 6**^{132,133,152,153}.

Immunoréactivité anti-COX-2	nulle	faible	modérée	forte	Etudes (N)
	0	1 - 2	3 - 4	6 - 12	2
score immunohistochimique	0	1 - 4	5 - 8	9 - 12	1
	0	1 - 3	4 - 7	8 - 16	1

Tableau 18 : Evaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2

Dans l'étude des carcinomes mammaires et des ostéosarcomes, Millanta et al.^{116,117} ont fait le choix d'évaluer **simultanément** la proportion de cellules tumorales marquées et l'intensité du marquage afin d'obtenir un score immunohistochimique (tableau 19).

Caractéristiques du marquage immunohistochimique anti-COX-2	Score IHC
<i>absence de marquage</i>	0
<i>marquage cytoplasmique diffus et d'intensité faible</i>	1
<i>marquage cytoplasmique granuleux, d'intensité modérée à forte, de 10 à 90% des cellules tumorales</i>	2
<i>marquage cytoplasmique, d'intensité forte, de 90% et plus des cellules tumorales</i>	3

IHC : immunohistochimique

Tableau 19 : Evaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2 par Millanta et al.^{116,117}

Dans l'étude des tumeurs colorectales, McEntee et al.¹¹³ ont évalué **séparément** le marquage des cellules **tumorales** et celui des cellules stromales **non tumorales** à l'aide d'échelles **différentes**. Dans leur étude, une tumeur exprimait la COX-2 lorsque le score obtenu pour les cellules stromales non tumorales était supérieur ou égal à 2 ou lorsque le score obtenu pour les cellules épithéliales tumorales était supérieur ou égal à 3.

V. VALEUR PRONOSTIQUE ET PREDICTIVE DE L'EXPRESSION TUMORALE DE LA COX-2³³

Il est nécessaire de distinguer la valeur **pronostique** qui permet d'évaluer l'effet des caractéristiques du patient ou de la tumeur sur l'évolution clinique de la valeur **prédictive** qui permet d'évaluer l'effet du traitement sur la tumeur⁷². L'étude de la valeur **pronostique** s'intéresse notamment à l'intérêt de la mise en évidence de l'expression de la COX-2 dans l'évaluation du risque d'extension métastatique, de récurrence locale et de décès.

Dans l'espèce humaine, dans les tumeurs colorectales, l'expression de la COX-2 est directement corrélée à **un mauvais pronostic et à plusieurs phénotypes cellulaires et paramètres cliniques** incluant la masse tumorale et la différenciation cellulaire, le nombre de nœuds lymphatiques métastatiques et le grade histopathologique¹¹². Plusieurs études ont également montré que l'expression de la COX-2 est corrélée à **une durée de rémission plus courte** dans le cancer du sein^{29,135,157}. La valeur **pronostique** de l'expression tumorale de la COX-2 reste cependant **très controversée** dans la plupart des tumeurs humaines. Certaines études ont en effet montré son utilité tandis que d'autres l'ont réfutée.

Dans les **tumeurs mammaires canines**, trois études menées sur 140 tumeurs malignes rapportent une corrélation entre la surexpression de la COX-2 et **un pronostic moins bon**^{98,151,153}. La surexpression était en effet corrélée à la **présence de métastases au moment de l'exérèse**, au **développement de métastases au cours du suivi** et à une **durée de**

vie globale ou sans récurrence plus courte. Une analyse multivariée effectuée par Queiroga et al.¹⁵² a cependant montré que l'expression de la COX-2 n'était pas un facteur pronostique **indépendant**.

Dans les **ostéosarcomes canins**, Mullins et al.¹²⁷ ont obtenu des résultats similaires en mettant en évidence une corrélation entre la surexpression de la COX-2 et **une durée de vie globale plus courte**.

Dans les **tumeurs mélanocytaires canines**, Martinez et al.¹¹⁰ ont montré grâce à une **analyse multivariée** que l'expression de la COX-2 était un facteur pronostique **indépendant** de l'évolution clinique des mélanomes oraux.

Dans les **mastocytomes canins**, Prada et al.¹⁴⁵ ont mis en évidence une corrélation entre l'**intensité** du marquage immunohistochimique anti-COX-2 et le **grade histologique**. Cependant, des résultats équivalents entre la **proportion** de cellules tumorales marquées, le **score immunohistochimique** et le **grade histologique** n'ont pas été obtenus. A l'inverse, une étude récente n'a pas mis en évidence de corrélation entre l'expression de la COX-2 et le grade histologique dans les mastocytomes canins¹⁹⁵.

Des résultats **contradictaires** ont également été obtenus dans des types tumoraux différents. Dans les **carcinomes épidermoïdes cutanés**, Poggiani et al.¹⁴⁴ n'ont pas mis en évidence de corrélation entre l'expression de la COX-2 et celle de la protéine **Ki-67** bien que ce marqueur de **prolifération cellulaire** soit considéré comme un **facteur pronostique** dans les tumeurs mammaires, les tumeurs mélanocytaires et les mastocytomes cutanés^{97,162,198,210}.

Dans les **tumeurs mélanocytaires de l'uvée**, une étude a montré que l'expression de la COX-2 ne permettait pas de **différencier** les tumeurs bénignes et malignes¹³⁷. Ces résultats restent difficiles à interpréter car la COX-2 est présente également dans la plupart des structures oculaires **normales**. Dans les **carcinomes prostatiques et les carcinomes nasaux**, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'expression de la COX-2 et la durée de vie globale ou sans récurrence^{8,176}.

Dans l'espèce canine, on ne dispose pas, à l'heure actuelle, d'informations suffisantes pour évaluer avec précision la valeur **pronostique** de l'expression tumorale de la COX-2. Les études cliniques comportent peu de cas, ce qui engendre une puissance statistique **faible**.

Une étude s'est intéressée à la valeur **prédictive** de l'expression tumorale de la COX-2 c'est à dire à son intérêt dans l'évaluation de la capacité de réponse tumorale à un traitement anticancéreux. Dans cette étude sur les **carcinomes vésicaux à cellules transitionnelles**, l'expression de la COX-2, la concentration tumorale en PGE₂ ou la combinaison de ces deux facteurs n'ont pas permis d'évaluer la réponse tumorale à un traitement **inhibiteur de la COX-2**¹³⁰.

VI. INHIBITEURS DE LA COX-2 ET THERAPIE ANTICANCEREUSE

A. Rappels sur les inhibiteurs de la COX-2 et leur mode d'action

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) exercent leur action en bloquant l'activité des **deux isoformes** de la cyclo-oxygénase (COX) par **altération enzymatique** ou **inhibition compétitive** du récepteur à l'acide arachidonique (AA). Ils exercent notamment leur action en bloquant la COX-2 qui est l'isoforme impliquée dans la synthèse de la majorité

des prostaglandines de la réaction inflammatoire. Les AINS sont des **inhibiteurs de la COX-2**, ce qui leur confère des propriétés **anti-inflammatoires, anti-pyrétiques et analgésiques**.

Tous les AINS exercent leur action en bloquant également, de manière plus ou moins importante, l'isoforme constitutive COX-1. Ils peuvent ainsi perturber la synthèse des molécules homéostatiques impliquées dans la **protection de la muqueuse gastrique**, le maintien de la **perfusion rénale** ou la régulation de l'**agrégation plaquettaire**. Cela a conduit les recherches à développer des molécules de plus en plus **sélectives de la COX-2** afin de **limiter les effets secondaires**, notamment **digestifs**, liés à l'inhibition de la COX-1. Une famille d'AINS hautement sélective, les **coxibs**, a ainsi été créée dans les années 1990.

Parmi les AINS, on distingue quatre classes d'inhibiteurs de la COX : les inhibiteurs **COX-1 préférentiels**, les inhibiteurs **non sélectifs**, les inhibiteurs **COX-2 préférentiels** et les inhibiteurs **COX-2 sélectifs ou coxibs**⁴⁵.

Dans l'espèce canine, les AINS sont couramment utilisés dans le traitement des **états douloureux et inflammatoires** dont les crises arthrosiques en sont l'exemple. En dehors de ces indications, depuis les années 1990, de nombreuses études publiées ont montré que de **nombreux types tumoraux** exprimaient la COX-2.

1. Les inhibiteurs COX-1 préférentiels^{45,188}

Les inhibiteurs COX-1 préférentiels exercent leur action en bloquant **majoritairement l'activité de l'isoforme COX-1**. L'inhibiteur COX-1 préférentiel le plus couramment utilisé en médecine canine est l'**aspirine** à 0,5 mg/kg/j. Utilisée à des doses très faibles, l'aspirine inhibe exclusivement **l'activité plaquettaire de la COX-1** grâce à des concentrations systématiques très faibles qui préservent l'activité rénale et gastro-intestinale de la COX-1, ce qui limite l'apparition d'effets secondaires.

2. Les inhibiteurs non sélectifs⁴⁵

Les inhibiteurs non sélectifs exercent leur action en bloquant **à la fois l'activité de la COX-1 et de la COX-2**. Les prostaglandines synthétisées par la COX-1 étant impliquées dans de nombreuses fonctions homéostatiques, l'utilisation de ces AINS se caractérise par des effets secondaires **digestifs et rénaux**. Ces effets secondaires graves contre-indiquent l'usage à long terme de cette classe pharmacologique dans la plupart des situations rencontrées en médecine vétérinaire. L'inhibiteur non sélectif le plus couramment utilisé en oncologie canine est le **piroxicam** à 0,3 mg/kg/j.

3. Les inhibiteurs COX-2 préférentiels^{45,139}

Les inhibiteurs COX-2 préférentiels exercent leur activité de manière **plus importante sur la COX-2 aux doses thérapeutiques**. Le caractère préférentiel est défini en conditions *in vitro* par un ratio $CI_{50\ COX-1} / CI_{50\ COX-2}$ **supérieur à 1**. La **concentration inhibitrice 50** ($CI_{50\ COX-1}$) est la concentration à laquelle l'AINS diminue de 50% l'activité enzymatique de la COX-1. Cette classe pharmacologique est particulièrement utile quand l'agrégation plaquettaire doit être préservée, notamment chez les patients recevant des **anticoagulants** ou atteints de **troubles de l'hémostase primaire**. L'inhibiteur COX-2 préférentiel le plus couramment utilisé en oncologie canine est le **méloxicam** à 0,1 mg/kg/j.

4. Les inhibiteurs COX-2 sélectifs^{45,77}

Les inhibiteurs COX-2 sélectifs ou **coxibs** bloquent de manière **encore plus importante l'activité de la COX-2 aux doses thérapeutiques**. Le caractère sélectif est défini en conditions *in vitro* par un ratio $CI_{50\ COX-1} / CI_{50\ COX-2}$ **supérieur à 1000**. On considère donc que ces AINS n'inhibent pas l'agrégation plaquettaire et sont les AINS **les mieux tolérés au niveau digestif**. L'inhibiteur COX-2 sélectif le plus couramment utilisé en cancérologie canine est le **firocoxib** à 5 mg/kg/j.

B. Cibles des inhibiteurs de la COX-2 indépendantes de la COX-2⁵⁰

L'effet pharmacologique de certains AINS, le **célécoxib** notamment, apparaît également être médié par des voies de synthèse **indépendantes de la COX-2** qui ne sont pas encore totalement caractérisées. Parmi les cibles potentielles, au moins deux composés cellulaires, la **PDK1** et les **SERCA**, semblent être directement contrôlés par le célécoxib^{94,148}. Ces résultats encouragent la mise au point de **dérivés du célécoxib** n'ayant plus d'effet inhibiteur sur la COX-2 mais un effet supérieur sur la **PDK1** ou les **SERCA**. L'OSU-03012 est un exemple de dérivé dont on espère qu'ils s'avéreront utiles en thérapie anticancéreuse²⁰⁹.

Dans l'espèce canine, la synthèse de la protéine **NAG-1** (NSAID-activated gene-1) est également induite par plusieurs AINS. Les résultats les plus prometteurs ont été obtenus expérimentalement avec le **piroxicam**²⁰³. D'autres gènes impliqués dans la carcinogenèse sont altérés par des concentrations physiologiques en AINS parmi lesquels l'EGR-1, le TSP-1 et l'ATF3^{6,12,122}. Ces gènes constitueront à l'avenir des sujets de recherche en cancérologie.

C. Inhibiteurs de la COX-2 et cultures de cellules tumorales

Les cultures cellulaires *in vitro* constituent des outils de qualité pour explorer le rôle de la COX-2 dans la carcinogenèse et évaluer de potentiels agents de chimiothérapie. Cependant, ces études restent rares chez les carnivores domestiques d'autant plus que seules des lignées cellulaires **canines** ont été développées pour le moment.

Des études ont montré que le NS398, un inhibiteur COX-2 sélectif, bloque de manière significative la synthèse de **PGE₂** et diminue ainsi la **prolifération cellulaire** de cellules mammaires tumorales et de kératinocytes tumoraux issus de carcinomes épidermoïdes oraux^{13,146}. Le méloxicam, un inhibiteur COX-2 préférentiel, a également montré *in vitro* un effet **pro-apoptotique et inhibiteur sur la croissance** de cellules canines tumorales issues d'ostéosarcomes²⁰². Comme cela a pu être montré dans l'espèce humaine, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la COX-2 contribue à **diminuer la prolifération des cellules canines tumorales** et à **contrôler la croissance tumorale**.

Les modèles de **xénogreffes tumorales** sur des souris nues constituent une étape préalable aux essais cliniques dans l'étude *in vivo* des effets des inhibiteurs de la COX-2. En récréant un environnement **dynamique**, elles offrent en effet la possibilité d'évaluer *in vivo* l'effet de ces principes actifs sur la **croissance** et l'**angiogenèse tumorales** ou l'**apoptose**.

Bien que cela ait été réalisé dans l'espèce humaine^{119,207}, des xénogreffes de tumeurs mammaires canines ont été utilisées dans une seule étude sur les **inhibiteurs de la COX-2**¹⁷⁵. Le **déracoxib** et le **piroxicam** ont montré un effet inhibiteur sur la croissance des xénogreffes chez la souris, suggérant qu'ils pouvaient faire l'objet d'études cliniques prospectives.

D. Inhibiteurs de la COX-2 et chimioprévention

Le terme **chimioprévention** a été employé pour la première fois en 1976 par Sporn pour décrire l'effet de la vitamine A sur la carcinogenèse chimique¹⁷⁹. La chimioprévention désigne l'utilisation de substances naturelles ou synthétiques dans le but d'**interrompre, de modifier ou de retarder la carcinogenèse**⁷⁰.

Au cours des dernières décennies, dans l'espèce humaine, de nombreuses études épidémiologiques ont suggéré que les AINS auraient un **effet chimiopréventif dans les cancers colorectaux** et dans une moindre mesure dans les cancers du sein et du poumon. Ces études ont en effet mis en évidence une **relation inverse entre l'incidence de cancer et la consommation régulière d'AINS**^{61,170}. L'effet bénéfique des AINS dans la carcinogenèse colorectale a été confirmé par **deux essais cliniques randomisés de grand effectif** avec le **sulindac**, un inhibiteur non sélectif et le **célécoxib**, un inhibiteur COX-2 sélectif^{51,180}.

Dans l'espèce canine, l'effet chimiopréventif des inhibiteurs de la COX-2 n'a pour le moment pas encore été clairement établi. Les recherches se focalisent en effet davantage sur le rôle des inhibiteurs de la COX-2 dans le **traitement** des tumeurs canines.

E. Inhibiteurs de la COX-2 et traitement des tumeurs

1. Inhibiteurs de la COX-2 et chimiothérapie conventionnelle¹⁰²

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'association des AINS et des agents de chimiothérapie conventionnelle avait un effet **synergique** sur l'inhibition de la croissance tumorale¹⁰⁹. Teicher et al.¹⁸⁴ ont montré la capacité des inhibiteurs de la COX-2 à agir comme des **modulateurs** des thérapies anticancéreuses cytotoxiques grâce à un modèle de cancer du poumon non à petites cellules. Hida et al.⁶⁷ ont également montré que le nimésulide, un inhibiteur COX-2 préférentiel, améliore l'**effet cytotoxique et pro-apoptotique** du **cisplatine** et de l'**étoposide**, deux agents de chimiothérapie conventionnelle, sur des lignées de cellules pulmonaires tumorales.

Dans les **carcinomes vésicaux canins à cellules transitionnelles**, un pourcentage **supérieur** de rémission (57%) a été obtenu en **associant le firocoxib** au cisplatine par rapport au cisplatine seul, **sans toxicité rénale ou digestive supplémentaire**⁸⁸. Ces résultats ont été confirmés par une autre étude clinique sur 32 chiens qui a montré une **meilleure évolution clinique** en associant le **firocoxib au cisplatine** par rapport au cisplatine seul¹⁰¹.

Dans les **carcinomes épidermoïdes oraux**, un pourcentage **supérieur** de rémission (56%) a également été obtenu en **associant le piroxicam au cisplatine** par rapport au piroxicam seul⁹. Dans les **lymphomes multicentriques**, l'association du **piroxicam** à la doxorubicine n'a cependant pas apporté de bénéfice par rapport à la doxorubicine seule¹²⁹.

2. Inhibiteurs de la COX-2 et chimiothérapie métronomique¹²⁸

L'administration d'agents de chimiothérapie conventionnelle à **petite dose** et de façon **continue** est appelée chimiothérapie **métronomique** ou chimiothérapie **antiangiogénique**. Cette démarche semble en effet cibler davantage les **cellules endothéliales** et l'**angiogenèse tumorale** que les cellules tumorales⁸². C'est un modèle thérapeutique prometteur qui présente de nombreux avantages tels que les faibles effets secondaires escomptés, la relative incapacité

des cellules endothéliales non tumorales à développer des **résistances**, son faible **coût** et sa **commodité** d'administration pour les propriétaires.

Dans l'espèce humaine, des résultats favorables ont été obtenus dans le cancer du sein, les mélanomes, les sarcomes des tissus mous et les cancers prostatiques. Dans l'espèce canine, seuls des essais cliniques de chimiothérapie métronomique dans les **hémangiosarcomes spléniques** et les **sarcomes des tissus mous** ont été publiés^{14,39,96,190}. Dans deux de ces études, un AINS, le **piroxicam**, était administré à 0,3 mg/kg/j.

3. Inhibiteurs de la COX-2 et radiothérapie¹⁰²

En conditions *in vitro*, on a montré que l'apport exogène de prostaglandines engendrait une plus grande résistance des lignées cellulaires normales et tumorales aux radiations. L'association des AINS et de la radiothérapie aurait par ailleurs un effet **synergique** sur l'inhibition de la croissance tumorale. Cela a été montré avec l'administration quotidienne de SC-236, un inhibiteur COX-2 sélectif⁸⁶. Pyo et al.¹⁴⁷ ont également montré, en conditions *in vitro* et *in vivo*, que le NS-398, un inhibiteur COX-2 sélectif, potentialisait l'effet des radiations **uniquement sur des tumeurs exprimant la COX-2**.

4. Inhibiteurs de la COX-2 et inhibiteurs de l'EGFR⁵⁰

On a mis en évidence très récemment une interaction entre la voie de synthèse de la COX-2 et celle du **récepteur au facteur de croissance épidermique** (EGFR). L'association d'inhibiteurs de la COX-2 et de l'EGFR semble donc être une thérapie rationnelle. La PGE₂ favorise en effet l'activation de l'EGFR *via* l'amphiréguline, tandis que l'EGFR activé favorise la surexpression de la COX-2 *via* la voie des MAP kinases. Cette association constitue un sujet de recherche prometteur en cancérologie.

5. Inhibiteurs de la COX-2 et traitement de la douleur d'origine cancéreuse^{75,100}

La prise en charge de la douleur en cancérologie canine associe fréquemment un **AINS** et un **morphinique**. Dans l'espèce canine et humaine, plusieurs études ont montré l'efficacité des **inhibiteurs COX-2 sélectifs** dans le traitement des **douleurs aiguës** et **chroniques**. La COX-2 est en effet impliquée aussi bien au niveau **central** que **périphérique** lors de la sensibilisation du système nerveux par une inflammation périphérique. Ces inhibiteurs COX-2 sélectifs, dont les effets secondaires sont **moindres**, sont particulièrement intéressants **après une chirurgie** lorsque des saignements sont redoutés.

6. Inhibiteurs de la COX-2 et traitement des tumeurs canines

Dans les **carcinomes vésicaux à cellules transitionnelles**, quatre études cliniques ont montré des résultats prometteurs^{88,89,101,106,118}. Dans deux études, une **évolution clinique comparable** à celles obtenue avec une **chimiothérapie conventionnelle** est rapportée pour 52 chiens recevant **uniquement du piroxicam** (rémission complète ou partielle dans 18 à 33% des cas et stabilisation dans 50 à 53% des cas)^{89,118}. Des résultats similaires ont été obtenus avec du **firocoxib** dans deux études menées respectivement sur 15 chiens (rémission partielle dans 20% des cas et stabilisation dans 33% des cas)⁸⁸ et sur 11 chiens (absence de progression tumorale dans 73% des cas)¹⁰¹. Une étude clinique a également mise en évidence

une **rémission partielle ou une stabilisation** pour 8 chiens recevant du **firocoxib seul ou en association avec une chimiothérapie conventionnelle**¹⁰⁶.

Dans l'une des ces études, on a également mis en évidence une association entre la réponse tumorale, l'**induction de l'apoptose** et la réduction de la concentration urinaire en **facteurs pro-angiogéniques** tels que le bFGF¹¹⁸.

Dans les **tumeurs mammaires**, une revue de cas cliniques a montré une **meilleure réponse clinique** pour 12 chiens atteints de **carcinome mammaire inflammatoire** et recevant du **piroxicam** par rapport à 3 chiens traités avec de la doxorubicine²⁶. Dans les **tumeurs mammaires métastasées ou inopérables**, le **firocoxib** a également montré des résultats prometteurs sur la **qualité de vie** de quatre chiens traités¹⁵.

Dans les **tumeurs prostatiques**, une étude clinique a montré une **durée de vie significativement plus élevée** pour 16 chiens traités avec des inhibiteurs COX-2 non sélectifs, **piroxicam et carprofène**, par rapport aux 17 chiens ne recevant pas d'AINS (6,9 mois contre 0,7 mois)¹⁷⁶.

Dans les **carcinomes épidermoïdes oraux**, une étude clinique menée sur 17 chiens recevant du **piroxicam** a montré une **rémission**, partielle ou complète, dans 18% des cas et une **stabilisation** dans 29% des cas¹⁶⁶.

Dans les **mélanomes oraux**, une étude clinique menée sur 11 chiens traités avec du **piroxicam et du cisplatine**, a montré une rémission partielle dans 18% des cas et une stabilisation dans 10% des cas⁹.

Bien que les données cliniques soient pour le moment limitées à quatre types tumoraux, elles sont encourageantes et nous amènent à investiguer davantage l'**effet antitumoral** des inhibiteurs de la COX-2 dans l'espèce canine, utilisés **seuls ou en association** avec d'autres traitements anticancéreux (tableau 20).

Type tumoral	Traitement	Résultats	Etude
<i>Carcinomes transitionnels vésicaux</i>	piroxicam ¹	RC 2/34 RP 4/34 S 18/34 P 10/34 (MS : 181 j)	Knapp et al. 1994
	piroxicam ¹	RP 6/18 S 9/18 P 3/18	Mohammed et al. 2002
	firocoxib ²	RP ou S 4/4	Lloret et al. 2007
	firocoxib ¹ + chimiothérapie	RP ou S 4/4	
	firocoxib ²	RP ou S 8/11 P 3/11 (MS : 80 j)	Léon-Artozqui et al. 2008
	firocoxib ² + cisplatine ³	RP ou S 10/10 P 0/10 (MS : 178 j)	
	firocoxib ²	RP 3/12 S 5/12 P 4/12 (MS : 105 j)	Knapp et al. 2013
firocoxib ² + cisplatine ³	RP 8/11 S 3/11 (MS : 186 j)		
<i>CMI</i>	piroxicam ¹	qualité de vie améliorée 7/7 (MS : 185 j)	de M. Souza et al. 2009
<i>Tumeurs mammaires</i>	firocoxib ²	qualité de vie améliorée 4/4	Castillo et al. 2010
<i>Carcinomes épidermoïdes oraux</i>	piroxicam ¹	RC 1/17 RP 2/17 S 5/17 P 9/17	Schmidt et al. 2001
	piroxicam ¹ + cisplatine ⁴	RC 2/9 RP 3/9 S 3/9 P 1/9 (MS : 237 j)	Boria et al. 2004
<i>Carcinomes prostatiques</i>	piroxicam ¹ ou carprofène ⁵	MS : 214 j	Sorenmo et al. 2004
<i>Mélanomes oraux</i>	piroxicam ¹ + cisplatine ⁴	RP 2/11 S 1/11 P 8/11 (MS : 119 j)	Boria et al. 2004
<i>Lymphomes multicentriques</i>	piroxicam ¹ + doxorubicine ⁶	RC ou RP 26/33	Mutsaers et al. 2002

CMI : carcinomes mammaires inflammatoires ; RC : rémission complète ; RP : rémission partielle ; S : stabilisation ; P : progression ; MS : médiane de survie

¹0,3 mg/kg SID ²5 mg/kg SID ³60 mg/m² tous les 21 jours ⁴50 mg/m² ⁵2,2 mg/kg BID ⁶30 mg/m² tous les 21 jours

Tableau 20 : Inhibiteurs de la COX-2 et traitement des tumeurs canines

VII. LA CYCLO-OXYGENASE-2 EN CANCEROLOGIE HUMAINE

A. Expression de la COX-2 et tumeurs solides humaines

Dans l'espèce humaine, un grand nombre d'études suggèrent que les prostaglandines produites par l'activité de la COX-2 contribuent à la carcinogénèse⁵⁴. Le **cancer colorectal** est le premier cancer pour lequel le rôle de la COX-2 et des prostaglandines a été suspecté sur la base de résultats épidémiologiques qui montraient un risque plus faible de cancer associé à une prise régulière d'aspirine à faible dose^{24,187}. Ces résultats ont été complétés par des études qui ont montré une surexpression de la COX-2 dans les cancers colorectaux^{38,81,165}.

Une expression de la COX-2 a également été mise en évidence dans de nombreux autres types tumoraux tels que **le cancer du sein, du poumon, de la prostate, du pancréas, de la tête, du cou et de l'estomac**^{29,43,47,57,59,66,68,177}.

B. Perspectives thérapeutiques

Afin de compléter les démarches thérapeutiques actuelles qui ciblent l'activité fonctionnelle de la COX-2 par les AINS, de nouvelles stratégies thérapeutiques se développent actuellement. Leur objectif est d'agir en amont **sur les voies de signalisation et les éléments de réponse à l'origine de l'induction transcriptionnelle** du gène de la COX-2.

Ce contrôle thérapeutique de la **transcription de la COX-2** est envisagé grâce à l'utilisation d'**oligonucléotides compétiteurs** des séquences régulatrices du gène **Ptgs2**. La vectorisation de **gènes correcteurs ou suicides** dans les cellules tumorales surexprimant la COX-2 est également étudiée. En aval, il est raisonnable d'imaginer que des **ARN interférents** ciblant de manière spécifique les messagers de la COX-2 puissent également apporter un bénéfice par rapport aux démarches thérapeutiques actuelles.

Une meilleure connaissance des mécanismes de **stabilisation** et de **dégradation** de la COX-2 ainsi que l'étude des **relations fonctionnelles** entre les deux isoformes de la COX pourraient permettre d'améliorer l'impact thérapeutique de ces nouveaux composés.

VIII. CONCLUSION

Dans l'espèce canine et humaine, la COX-2 est un **acteur majeur de la progression tumorale** qui exerce un rôle critique **à tous les stades de la cancérogenèse**. Elle se comporte comme un **promoteur tumoral** *via* l'activation de procarcinogènes en carcinogènes mais elle assure également le développement tumoral en favorisant **l'invasion tumorale et l'extension métastatique**. Bien que l'expression de la COX-2 ait été mise en évidence dans un grand nombre de tumeurs canines, l'implication de la COX-2 dans la carcinogénèse et ses mécanismes sont encore partiellement compris.

Cibler la COX-2 en thérapie anticancéreuse demeure un concept unique, à la frontière entre médecine traditionnelle et moléculaire. Cette cible thérapeutique peut être atteinte grâce à des **inhibiteurs pharmacologiques**, les AINS, qui agissent sur l'activité **fonctionnelle** de la COX-2 mais également en agissant en amont **sur les voies de signalisation ou les éléments de réponse à l'origine de l'induction transcriptionnelle** du gène de la COX-2.

Concernant les inhibiteurs de la COX-2, leur usage en médecine vétérinaire dans le traitement des tumeurs se fonde sur quelques études cliniques menées notamment sur les

carcinomes vésicaux à cellules transitionnelles. Leur utilisation semble prometteuse mais nécessite d'être **confirmée** par la suite.

Les effets des AINS qui sont indépendants de leur activité pharmacologique sur la COX-2 doivent être explorés. La COX-2 est une cible potentielle mais également un **signal** impliqué dans des processus clés de la carcinogenèse. De nouvelles cibles seront probablement trouvées en explorant **les voies de synthèse de la COX-2**.

A l'heure actuelle, les inhibiteurs de la COX-2 constituent probablement **un outil à part entière** dans le traitement des **tumeurs canines**. Les résultats obtenus sur l'effet antitumoral des inhibiteurs de la COX-2 devront être confirmés et les types tumoraux précisés par des **études cliniques prospectives**.

Dans l'espèce canine et humaine

La COX-2 est exprimée dans un grand nombre de types tumoraux

La COX-2 et la PGE₂ participent à la carcinogenèse via notamment l'EGFR, les PPAR et les MAPK

Les inhibiteurs de la COX-2 sont de plus en plus l'objet d'études cliniques

Dans l'espèce humaine

Des études épidémiologiques ont montré l'effet chimiopréventif des AINS dans le cancer du côlon, du sein et du poumon

Des essais précliniques ont montré des résultats prometteurs avec des polythérapies associant chimiothérapie ou radiothérapie et inhibiteurs de la COX-2

Des essais cliniques sur des patients atteints de polypose adénomateuse colique familiale ont montré l'efficacité des coxibs dans la réduction du nombre et de la taille des polypes

L'expression de la COX-2 est corrélée à une évolution clinique défavorable dans un grand nombre de types tumoraux incluant le cancer du côlon, du sein et du poumon

Dans l'espèce canine

La surexpression de la COX-2 est corrélée à un pronostic moins bon dans les tumeurs mammaires, les ostéosarcomes et les mélanomes oraux

Les inhibiteurs de la COX-2 sont à l'origine d'une meilleure évolution clinique dans les carcinomes vésicaux à cellules transitionnelles, les carcinomes mammaires inflammatoires et les carcinomes prostatiques

EGFR : epidermal growth factor receptor ; PPAR : peroxisome proliferator activated receptor ; MAPK : mitogen-activated protein kinase

Tableau 21 : La COX-2 en cancérologie humaine et canine (adapté de Liao et al.¹⁰²)

DEUXIEME PARTIE

**ÉTUDE PRELIMINAIRE DE L'USAGE DES INHIBITEURS DE LA COX-2 DANS LE
TRAITEMENT DES TUMEURS CANINES**

I. MATERIEL ET METHODES

A. Inclusion des cas

Entre le 1^{er} octobre 2009 et le 1^{er} février 2012, ont été inclus dans cette étude préliminaire, tous les chiens présentés en consultation de cancérologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) pour lesquels un prélèvement de tumeur maligne d'origine épithéliale ou mésoenchymateuse avait été réalisé.

B. Matériel tumoral

L'ensemble des prélèvements étudiés correspond à des **pièces d'exérèse chirurgicale**, à des **biopsies** ou à des **prélèvements nécropsiques** réalisés à l'ENVT entre le 10 décembre 2007 et le 26 juin 2012 sur **19 chiens** atteints de **tumeurs malignes solides**.

Les prélèvements ont été **fixés** dans une solution de formol tamponné à la neutralité, recoupés, **inclus et archivés** en blocs de **paraffine** par le Laboratoire d'Anatomie pathologique de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse Cedex, France). Les délais de fixation sont ceux du diagnostic histologique de routine. Certains échantillons ont également subi une étape de **décalcification** préalable, d'une durée variable, en raison de la présence de **tissu osseux** dans le prélèvement.

C. Données cliniques et paracliniques

Pour chaque animal, le **race**, l'**âge** et le **sexe** ont été rapportés. Les données relatives à l'évolution clinique des **lésions tumorales** (taille, récurrence locale et extension métastatique à distance) et des **animaux** (qualité de vie, effets secondaires et pronostic vital) ont été recueillies lorsque les chiens étaient présentés en consultation de cancérologie à l'ENVT.

Au moment du diagnostic, un bilan d'extension métastatique a été réalisé par imagerie thoracique (radiographie ou tomodensitométrie) et/ou abdominale (échographie).

Lorsqu'un inhibiteur de la COX-2 a été administré, un suivi de la fonction rénale a été effectué en comparant la valeur de la créatinine plasmatique obtenue au moment de la mise en place du traitement aux valeurs obtenues pendant la durée du traitement. Ces analyses ont été réalisées dans des conditions similaires (à jeun, état d'hydratation correct et analyseur identique) et ont été accompagnées d'une analyse d'urine. Dans le cadre de cette étude préliminaire, lorsque du **firocoxib** a été administré, il était fourni par le laboratoire Merial.

D. Technique histopathologique conventionnelle

Les prélèvements, inclus en paraffine, ont fait l'objet de coupes d'environ **3 µm** d'épaisseur qui ont été recueillies sur des lames de verre (lames Starfrost) afin d'en permettre l'observation en microscopie photonique. Les lames ainsi obtenues ont été séchées à l'étuve pendant une nuit à 37-40°C puis **déparaffinées** dans du toluène (3 bains de 5 minutes) avant d'être réhydratées dans des bains d'éthanol de concentrations décroissantes (éthanol absolu : 1 bain de 5 minutes, éthanol à 95° : 1 bain de 5 minutes, eau courante : 1 bain de 5 minutes).

Une coloration conventionnelle **Hémalum-éosine** a ensuite été pratiquée : les lames ont été plongées 1 minute et 30 secondes dans une solution d'Hémalum de Mayer, rincées à l'eau courante pendant 5 minutes puis plongées 3 secondes dans une solution d'éosine-

érythrosine aqueuse à 2%. Les lames ont été à nouveau rincées à l'eau courante, déshydratées dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes, puis placées dans du toluène. Des lamelles ont alors été montées **en milieu synthétique** avant la lecture des lames.

L'examen histopathologique permet en premier lieu de **confirmer la nature tumorale** de la néoformation et de la **caractériser**.

E. Technique de détection immunohistochimique de la COX-2

La technique immunohistochimique a été réalisée sur des sections issues de coupes **sériées et adjacentes** à celles utilisées pour l'examen histopathologique. Elle a permis la mise en évidence de l'isoforme COX-2 sur des coupes tissulaires de prélèvements tumoraux **fixés au formol et inclus en paraffine**. Le protocole de détection de cette enzyme a été établi après des **essais méthodologiques préliminaires** permettant l'obtention de techniques **standardisées** parfaitement **reproductibles**. Le coût lié à la réalisation et à l'interprétation de la détection immunohistochimique de la COX-2 a été pris en charge par le laboratoire Merial.

1. Anticorps primaire

L'anticorps **monoclonal M3617** (isotype IgG₁, kappa, clone CX-294, DAKO) produit chez la souris est spécifique d'un peptide de synthèse correspondant aux acides aminés 580 à 598 de la COX-2 **humaine**.

Sa spécificité a été mise en évidence dans deux études par **Western blot** et **dosage immuno-enzymatique**^{23,58}. Dans ces deux études, le clone CX-294 a marqué la COX-2 humaine exprimée par des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (**HUVEC**) après stimulation par du phorbol myristate acetate (**PMA**).

Cet anticorps destiné à marquer **spécifiquement** l'isoforme COX-2 a été sélectionné à partir de données bibliographiques qui ont montré son aptitude à reconnaître des épitopes sur des prélèvements de tissus **humains et canins**^{5,23,58,110,144,160}. Il nous a été fourni par le laboratoire Merial.

2. Essais préliminaires

Dans le but d'obtenir le meilleur marquage compatible avec une détérioration minimale des tissus, la technique immunohistochimique a été établie après des essais méthodologiques préliminaires. Ils nous ont permis d'obtenir une technique **standardisée** parfaitement **reproductible**. L'effet engendré par la variation de plusieurs paramètres (**solution de démasquage antigénique, dilution de l'anticorps primaire, chromogène**) a également été étudié en marquant des tissus canins tumoraux. Les variations concernant ces divers paramètres sont présentées ci-après. La technique immunohistochimique retenue est présentée en annexe 2.

3. Immunomarquages

Des coupes de **3 µm** d'épaisseur ont été recueillies sur des lames de verre (lames Starfrost). Les lames ainsi obtenues ont été **séchées** à l'étuve pendant une nuit à 37-40°C puis **déparaffinées** dans du toluène (3 bains de 5 minutes) puis plongées dans l'acétone (2 bains de 5 minutes) avant d'être **réhydratées** dans l'eau courante (1 bain de 5 minutes).

a. Démasquage antigénique

Afin de restaurer l'antigénicité des épitopes reconnus par l'anticorps primaire, les lames ont subi un **prétraitement** appelé **démasquage antigénique**. Deux types de prétraitements ont été testés : les lames ont été plongées pendant 30 minutes dans un bain-marie à 94-96°C, additionné d'une solution de citrate à 10 mM (pH 6) ou d'EDTA (pH 9).

La solution de **citrate à 10 mM** (pH 6) a été retenue pour la réalisation des marquages immunohistochimiques de cette étude préliminaire.

b. Principales étapes techniques

Les étapes suivantes sont celles d'une méthode **streptavidine-biotine-peroxydase** : Dans un premier temps, **l'inhibition des peroxydases endogènes** est réalisée dans un bain de « Peroxidase Blocking Solution » (S2023, DAKO) pendant 5 minutes à température ambiante. Afin de **minimiser les fixations non spécifiques**, un sérum normal de chèvre dilué au 1/10^{ème} dans du PBS a ensuite été appliqué pendant 20 minutes à température ambiante.

L'anticorps primaire dirigé contre l'épitope de la COX-2 est ensuite appliqué pendant 50 minutes à température ambiante. Trois dilutions différentes ont été testées : au 1/50^{ème}, au 1/100^{ème} ou au 1/200^{ème} dans une solution de PBS. La dilution au **1/200^{ème}** a été retenue pour la réalisation des marquages immunohistochimiques de cette étude préliminaire.

L'anticorps primaire étant produit chez la souris, un **anticorps secondaire** de chèvre **biotinylé** dirigé contre les **chaînes lourdes des immunoglobulines de souris** (K0675, LSAB®2, DAKO) a été appliqué pendant 25 minutes à température ambiante.

Un complexe **streptavidine-biotine-peroxydase** (K0675, LSAB®2, DAKO) a ensuite été appliqué pendant 25 minutes à température ambiante.

Deux chromogènes différents ont été testés : la révélation a été pratiquée en appliquant de l'Amino-Ethyl-Carbazole (AEC) pendant 20 minutes ou de la 3,3'-diaminobenzidine tétrachlorure (DAB) pendant 10 minutes. Le **chromogène DAB** a été retenu pour la réalisation des marquages immunohistochimiques de cette étude préliminaire.

Une **contre-coloration des noyaux** par **l'Hématoxyline de Harris** a ensuite été effectuée puis un rinçage à l'eau courante et une déshydratation. Les lames ont été finalement montées à l'aide d'un **baume synthétique** suivant les procédures usuelles.

4. Contrôles

Durant les essais méthodologiques préliminaires, un **contrôle négatif par omission de l'anticorps primaire** a été réalisé. Un second contrôle négatif a été réalisé en remplaçant l'anticorps primaire par une immunoglobuline anti-CD₃ de **même isotype IgG₁** afin de permettre la caractérisation d'une hypothétique fixation non spécifique des anticorps.

F. Lecture et interprétation des lames

1. Analyse histopathologique

La lecture des échantillons colorés à l'Hémalun-éosine, en vue de leur classification histologique, a été effectuée par **deux pathologistes certifiés** (M. Delverdier et MN. Lucas).

Les critères morphologiques et histologiques généraux de **malignité** ont été appliqués aux **21 prélèvements** de cette étude : croissance infiltrante, densité cellulaire augmentée, anisocaryose, anisocytose, index mitotique élevé et figures mitotiques atypiques, nombre augmenté de polycaryons et remaniements nécrotico-hémorragiques.

2. Analyse immunohistochimique

La lecture des prélèvements marqués par immunohistochimie a été effectuée par **deux pathologistes certifiés** (M. Delverdier et MN. Lucas). A partir de ces lames ont été notés :

- l'**existence** et la **spécificité** du marquage anti-COX-2 : les cellules tumorales considérées positives expriment un marquage **cytoplasmique brun net**
- l'**intensité** du dépôt chromogénique
- la **proportion** de cellules tumorales marquées
- la **répartition** du marquage : **focale, multifocale** ou **diffuse**

L'évaluation du marquage immunohistochimique anti-COX-2 a été effectuée par observation des coupes tissulaires à faible grossissement (x40), avec détermination du nombre de cellules tumorales positives par rapport au nombre **total** de cellules tumorales présentes. Concernant l'évaluation de l'**intensité** du marquage anti-COX-2, c'est l'**intensité la plus intense** qui était observée au sein des cellules tumorales qui était prise en compte.

L'**immunoréactivité tumorale anti-COX-2** a été évaluée à l'aide d'un **score immunohistochimique** obtenu en multipliant le score de la **proportion** de cellules tumorales marquées par le score de l'**intensité** du marquage immunohistochimique. Les échelles de notation utilisées pour obtenir et interpréter ces scores ont été adaptées des travaux de **Soslow et al.**¹⁷⁷. 5 des 42 études sur l'expression tumorale de la COX-2 dans l'espèce canine ont également eu recours à cette méthode d'évaluation du marquage anti-COX-2^{127,133,150,152,153}.

La méthode d'évaluation de la **proportion** de cellules tumorales marquées était la suivante :

Proportion de cellules tumorales exprimant la COX-2	Score
<i>Absence de marquage</i>	0
<i>1 - 10% de cellules positives</i>	1
<i>11 - 50% de cellules positives</i>	2
<i>51 - 80% de cellules positives</i>	3
<i>81 - 100% de cellules positives</i>	4

Tableau 22 : Evaluation de la proportion de cellules tumorales exprimant la COX-2 (adapté de Soslow et al.¹⁷⁷)

La méthode d'évaluation de l'**intensité** du marquage des cellules tumorales était la suivante :

Intensité du marquage anti-COX-2 des cellules tumorales	Score
<i>Absence de marquage</i>	0
<i>Marquage faible</i>	1
<i>Marquage modéré</i>	2
<i>Marquage fort</i>	3

Tableau 23 : Evaluation de l'intensité du marquage anti-COX-2 des cellules tumorales (adapté de Soslow et al.¹⁷⁷)

La méthode d'évaluation de l'**immunoréactivité tumorale anti-COX-2** était la suivante :

Immunoréactivité tumorale anti-COX-2	Score IHC
<i>Nulle</i>	0
<i>Faible</i>	1 - 4
<i>Modérée</i>	5 - 8
<i>Forte</i>	9 - 12

IHC : immunohistochimique

Tableau 24 : Evaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2 (adapté de Soslow et al.¹⁷⁷)

G. Evolution clinique et traitement inhibiteur de la COX-2

Lorsqu'un inhibiteur de la COX-2 a été administré et que la lésion tumorale était accessible cliniquement, chaque cas a été répertorié dans une catégorie faisant référence à l'évolution clinique **suivant la mise en place** du traitement :

- **rémission complète (RC)** : absence d'élément clinique **ou** paraclinique évocateur d'un processus tumoral
- **rémission partielle (RP)** : diminution supérieure à 50% de la taille de la lésion tumorale **et** absence de toute nouvelle lésion tumorale (récidive locale, éclosion multicentrique ou extension métastatique)
- **stabilisation (S)** : diminution inférieure à 50% de la taille de la lésion tumorale **et** absence de toute nouvelle lésion tumorale
- **progression (P)** : augmentation supérieure à 50% de la taille de la lésion tumorale **ou** apparition de toute nouvelle lésion tumorale

Lorsque la lésion tumorale n'était pas accessible cliniquement, ces catégories étaient définies selon des critères permettant d'évaluer indirectement le processus tumoral :

- **rémission complète (RC)** : absence d'élément clinique **ou** paraclinique évocateur d'un processus tumoral
- **rémission partielle (RP)** : diminution des signes cliniques locaux **et** absence de toute nouvelle lésion tumorale (récidive locale, éclosion multicentrique ou extension métastatique)

- **stabilisation (S)** : stabilisation des signes cliniques locaux **et** absence de toute nouvelle lésion tumorale
- **progression (P)** : aggravation des signes cliniques locaux **ou** apparition de toute nouvelle lésion tumorale

Lorsqu'un inhibiteur de la COX-2 n'a pas été administré, chaque cas a été répertorié dans une catégorie faisant référence à l'évolution clinique **post-chirurgicale**.

Le délai entre la mise en place du traitement inhibiteur de la COX-2 et la chirurgie a également été rapporté pour chaque cas. En l'absence de chirurgie, c'est le délai entre la mise en place du traitement inhibiteur de la COX-2 et le diagnostic qui a été rapporté.

La durée de vie à partir de la mise en place du traitement inhibiteur de la COX-2 a également été rapportée pour chaque cas. En l'absence de traitement inhibiteur de la COX-2, c'est la durée de vie à partir de la chirurgie qui a été rapportée.

II. RESULTATS

A. Caractéristiques épidémiologiques de la population

Les 19 chiens de notre étude présentaient une **médiane** d'âge de **10,5 ans** au moment du diagnostic et une distribution comprise entre **3 et 12 ans** (figure 8).

Pour 15 chiens (79%), le diagnostic a été établi grâce à l'**analyse histopathologique** de la pièce d'exérèse de la tumeur primitive. Pour 4 chiens (21%), le diagnostic a été établi par **biopsie** ou **cytologie**. Le diagnostic établi par cytologie a été confirmé par une autopsie.

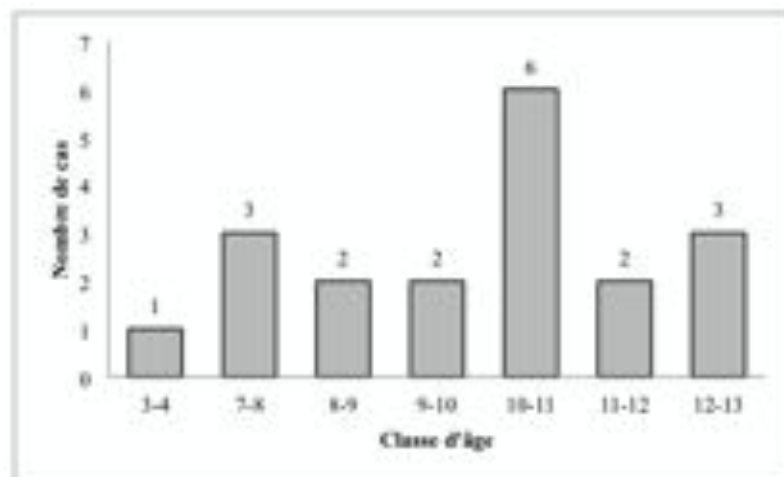


Figure 8 : Répartition des cas selon l'âge au moment du diagnostic

Dans notre population, 8 chiens sur 19 (42%) étaient des **mâles** ; 11 sur 19 (58%) étaient des **femelles**. 13 races étaient répertoriées. 16 chiens sur 19 (84%) étaient de **race pure** ; les 3 chiens restants (16%) étaient de **race croisée** (tableau 25).

Race	Nombre de cas
<i>Berger allemand</i>	1
<i>Berger belge tervueren</i>	1
<i>Bouledogue français</i>	1
<i>Boxer</i>	1
<i>Chien nu</i>	1
<i>Cocker</i>	1
<i>Coton de Tuléar</i>	1
<i>Croisé</i>	3
<i>Dalmatien</i>	1
<i>Labrador</i>	2
<i>Rottweiler</i>	2
<i>Setter anglais</i>	1
<i>Setter gordon</i>	1
<i>Yorkshire terrier</i>	2

Tableau 25 : Répartition des cas selon la race

B. Résultats de l'analyse histopathologique

Les tumeurs **épithéliales** sont les tumeurs les plus représentées dans cette étude avec 13 cas sur 19 (**68%**) et notamment les **carcinomes mammaires** avec 4 cas sur 13 (**31%**) (tableau 26). Les tumeurs mésoenchymateuses représentent 6 cas sur 19 (**32%**). L'ensemble des résultats de l'analyse histopathologique est présenté en annexe 3.

Type tumoral	Nombre de cas
<i>Carcinomes mammaires</i>	4
<i>Tumeurs nasales épithéliales</i>	3
<i>Carcinome épidermoïde cutané</i>	1
<i>Carcinome parathyroïdien</i>	1
<i>Carcinome thyroïdien</i>	1
<i>Carcinome corticosurrénalien</i>	1
<i>Carcinome transitionnel vésical</i>	1
<i>Adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal</i>	1
<i>Ostéosarcomes</i>	3
<i>Hémangiosarcomes</i>	2
<i>Liposarcome</i>	1

Tableau 26 : Répartition des cas selon le type tumoral

C. Résultats de l'analyse immunohistochimique

1. Contrôles

Les contrôles négatifs effectués par omission et remplacement de l'anticorps primaire par un anticorps de même isotype ont donné les résultats escomptés. Aucune immunoréactivité anti-COX-2 n'a en effet été mise en évidence.

2. Evaluation du marquage immunohistochimique anti-COX-2

a. Caractéristiques du marquage immunohistochimique anti-COX-2

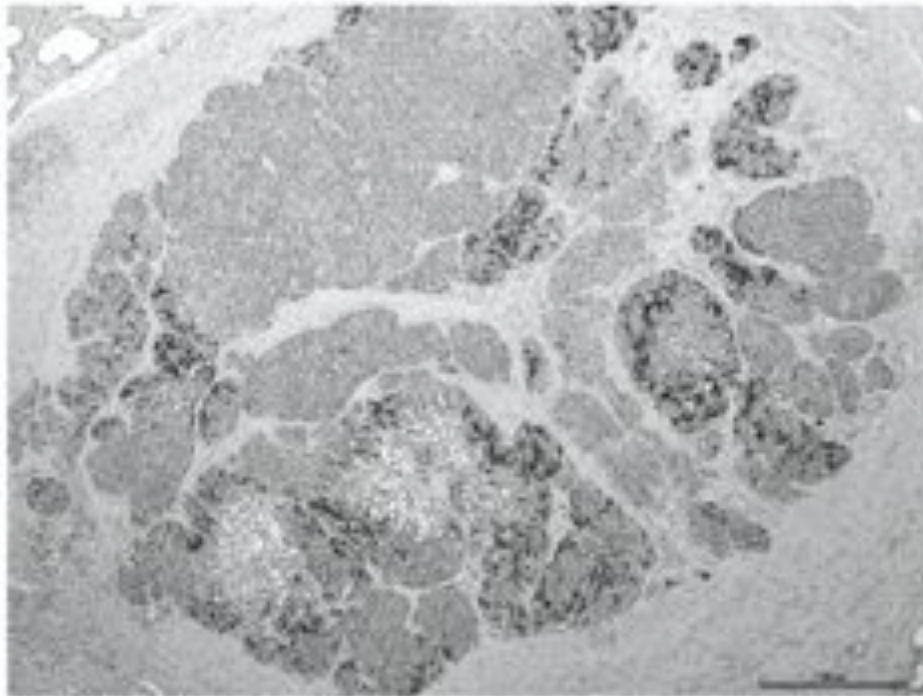
La réactivité obtenue lors de la détection de l'épitope de la COX-2 correspond à l'observation d'un **dépôt brun net** dans le **cytoplasme** de la cellule marquée. Ce marquage peut être, selon les cellules, un marquage cytoplasmique **diffus** ou **focal**.

b. Qualité et répartition du marquage immunohistochimique anti-COX-2

8 prélèvements sur 21 (38%) sont restés totalement **négatifs** après la détection immunohistochimique de la COX-2 (tableau 27). Un marquage immunohistochimique anti-COX-2 a été mis en évidence dans **13 prélèvements** sur 21 (62%) (tableau 27).

La qualité du marquage obtenu a été jugée **bonne** car le marquage se distinguait nettement d'un **bruit de fond** d'intensité variable, souvent faible, à distribution diffuse et concernant des constituants tissulaires divers.

On note, pour certaines lames, une **hétérogénéité dans la répartition** de la réactivité anti-COX-2 en fonction des territoires tumoraux présents sur la coupe histologique (tableau 27). Le marquage anti-COX-2 a en effet parfois été observé uniquement **en périphérie des zones de nécrose** (cas n°11 et 18) ou au sein d'un nodule tumoral (figure 9). L'ensemble des résultats est présenté en annexe 4.



Mamelle ; chien. Carcinome mammaire. Cellules épithéliales tumorales expriment un marquage cytoplasmique anti-COX-2 d'intensité forte (score = 3). Méthode streptavidine-biotine-peroxydase, contre-coloration des noyaux par l'hématoxyline de Harris. Grossissement x 40.

Figure 9 : Mise en évidence d'une immunoréactivité dans un seul nodule tumoral (cas n°9)

Cas (n°)	Prélèvement	Type tumoral	Qualité du marquage	Répartition du marquage
1	Exérèse Tumeur (lésion primitive)	Liposarcome	bonne	zones d'ulcération
1	Exérèse Tumeur (récidive n°1)	Liposarcome	bonne	épiderme réactionnel et zones d'ulcération
2	Biopsie	Carcinome nasal moyennement différencié	bonne	épithélium de surface
1	Exérèse Tumeur (récidive n°2)	Liposarcome		
3	Exérèse Métastase	Métastase nodale d'un adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal	bonne	multifocale
4	Biopsie	Carcinome nasal peu différencié		
5	Exérèse Tumeur	Ostéosarcome chondroblastique		
6	Exérèse Tumeur	Carcinome mammaire d'évolution anaplasique avec métastase nodale	bonne	multifocale
7	Biopsie	Adénocarcinome nasal bien différencié	bonne	multifocale
8	Exérèse Tumeur	Ostéosarcome ostéoblastique productif		
9	Exérèse Tumeur	Carcinome mammaire basaloïde infiltrant	bonne	focale
10	Exérèse Tumeur	Ostéosarcome		
11	Exérèse Métastase	Métastase nodale d'un adénocarcinome mammaire peu différencié	bonne	en périphérie des zones de nécrose
12	Exérèse Tumeur	Carcinome parathyroïdien		
13	Exérèse Tumeur	Hémangiosarcome splénique		
14	Exérèse Tumeur	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	bonne	cellules inflammatoires et épithélium
15	Exérèse Tumeur	Hémangiosarcome hépatique	bonne	multifocale
16	Exérèse Tumeur	Carcinome thyroïdien		
17	Exérèse Tumeur	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	bonne	diffuse
18	Autopsie	Carcinome transitionnel vésical	bonne	en périphérie des zones de nécrose
19	Exérèse Tumeur	Carcinome corticosurrénalien	bonne	diffuse
	absence de réactivité anti-COX-2			
	absence de réactivité tumorale anti-COX-2			

Tableau 27 : Evaluation de la qualité et de la répartition du marquage anti-COX-2

c. Evaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2

Une immunoréactivité anti-COX-2 a été mise en évidence dans **13 prélèvements**. Son évaluation a été réalisée à l'aide d'une méthode adaptée des travaux de **Soslow et al.**¹⁷⁷ (tableau 28). L'ensemble des résultats est présenté en annexe 4.

Dans **4 prélèvements** (31%), un marquage anti-COX-2 a été mis en évidence uniquement au sein des cellules **non tumorales** : des cellules **épithéliales de surface**, des cellules **inflammatoires** ou des cellules appartenant aux **zones d'ulcération** (cas n°1, 2 et 14). Le score immunohistochimique attribué était alors **0** car il traduit l'immunoréactivité **tumorale** anti-COX-2 (tableau 28).

Dans **9 prélèvements** (69%), un marquage anti-COX-2 a été mis en évidence au sein des cellules **tumorales**. On note, quelque soit le type de prélèvement, une **proportion assez faible** de cellules tumorales marquées : souvent 1 à 10% des cellules tumorales, parfois 11 à 50%. On note également une **faible variabilité de l'intensité** du marquage. L'immunoréactivité observée est le plus souvent d'intensité **modérée à forte** (figure 10).

Cas (n°)	Prélèvement	Type tumoral	Proportion de cellules tumorales marquées	Intensité du marquage	Score IHC
1	Exérèse Tumeur (lésion primitive)	Liposarcome	0	0	0
1	Exérèse Tumeur (récidive n°1)	Liposarcome	0	0	0
2	Biopsie	Carcinome nasal moyennement différencié	0	0	0
1	Exérèse Tumeur (récidive n°2)	Liposarcome			
3	Exérèse Métastase	Métastase nodale d'un adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal	1	1	1
4	Biopsie	Carcinome nasal peu différencié			
5	Exérèse Tumeur	Ostéosarcome chondroblastique			
6	Exérèse Tumeur	Carcinome mammaire d'évolution anaplasique avec métastase nodale	1	3	3
7	Biopsie	Adénocarcinome nasal bien différencié	1	3	3
8	Exérèse Tumeur	Ostéosarcome ostéoblastique productif			
9	Exérèse Tumeur	Carcinome mammaire basaloïde infiltrant	2	3	6
10	Exérèse Tumeur	Ostéosarcome			
11	Exérèse Métastase	Métastase nodale d'un adénocarcinome mammaire peu différencié	1	2	2
12	Exérèse Tumeur	Carcinome parathyroïdien			
13	Exérèse Tumeur	Hémangiosarcome splénique			
14	Exérèse Tumeur	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	0	0	0
15	Exérèse Tumeur	Hémangiosarcome hépatique	1	2	2
16	Exérèse Tumeur	Carcinome thyroïdien			
17	Exérèse Tumeur	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	2	3	6
			2	3	6
			1	2	2
18	Autopsie	Carcinome transitionnel vésical	1	3	3
19	Exérèse Tumeur	Carcinome corticosurrénalien	2	1	2

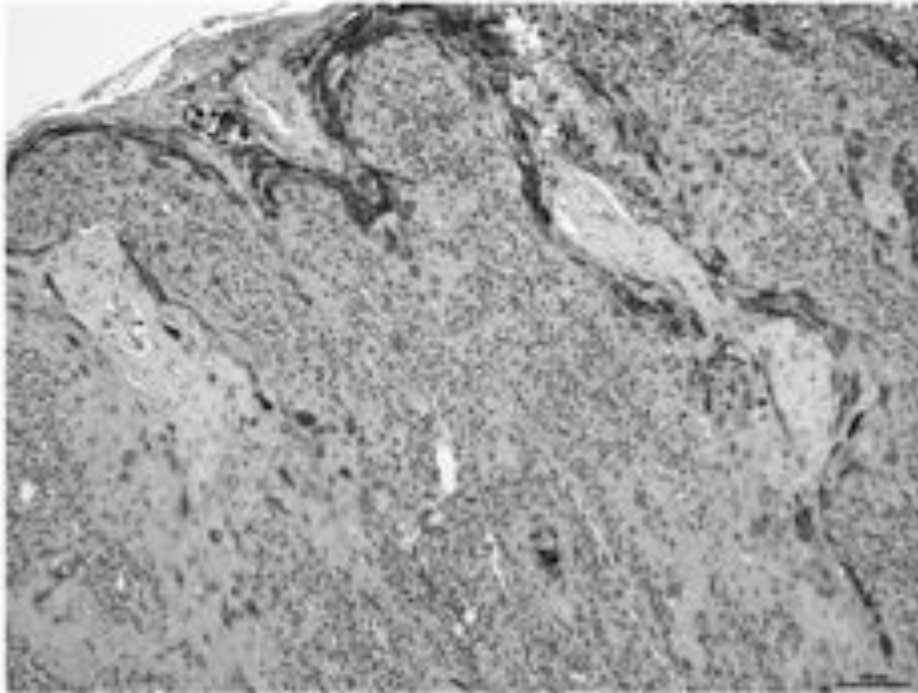
absence de réactivité anti-COX-2

absence de réactivité tumorale anti-COX-2

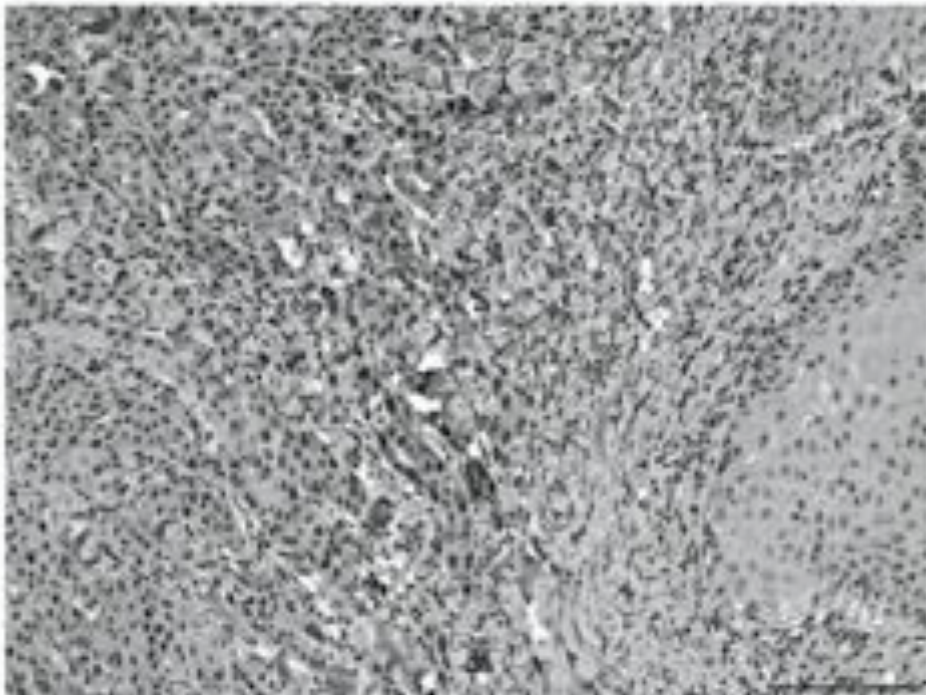
IHC : immunohistochimique

Tableau 28 : Evaluation de l'immunoréactivité tumorale anti-COX-2

Concernant le cas n°17, **trois lésions distinctes** ont été mises en évidence au sein du prélèvement tumoral. Il s'agissait en effet d'une pièce d'exérèse d'un carcinome épidermoïde cutané d'évolution **multicentrique**. Ces trois lésions exprimant un marquage anti-COX-2 différent (figure 10), le score immunohistochimique le plus **élevé** a été retenu pour évaluer l'immunoréactivité anti-COX-2 de la tumeur.



Peau ; chien. Carcinome épidermoïde d'évolution multicentrique. Cellules épithéliales tumorales exprimant un marquage cytoplasmique anti-COX-2 d'intensité forte (score = 3). Méthode streptavidine-biotine-peroxydase, contre-coloration des noyaux par l'Hématoxyline de Harris. Grossissement x 100.



Peau ; chien. Carcinome épidermoïde d'évolution multicentrique. Cellules épithéliales tumorales exprimant un marquage cytoplasmique anti-COX-2 d'intensité modérée (score = 2). Méthode streptavidine-biotine-peroxydase, contre-coloration des noyaux par l'Hématoxyline de Harris. Grossissement x 200.

Figure 10 : Variabilité de l'intensité du marquage des cellules tumorales (cas n°17)

D. Résultats anatomo-cliniques

1. Tolérance du traitement inhibiteur de la COX-2

Un inhibiteur de la COX-2 a été administré à 16 chiens (84%). Du **firocoxib** a été administré à 15 chiens à une posologie **médiane** de **5 mg/kg/j** pendant une durée comprise entre 6 et 559 jours. La posologie était comprise entre 3 et 8 mg/kg/j. Du **méloxican** à 0,1 mg/kg/j a été administré à un chien pendant 50 jours (tableau 29).

Ces inhibiteurs de la COX-2 ont été administrés seuls (4/16) ou en association avec une chimiothérapie conventionnelle (6/16) ou une chimiothérapie métronomique (6/16). Pour 12 chiens (75%), ils ont été administrés après l'exérèse chirurgicale de la tumeur primitive (tableau 29).

Pour 14 chiens (88%), les données de suivi clinique ont permis d'avoir au moins **2 mois** de recul après la mise en place d'un traitement inhibiteur de la COX-2. Pour 5 de ces chiens (31%), le suivi clinique a été obtenu pendant au moins **6 mois**.

Cas (n°)	Type tumoral	Chirurgie	AINS	Association
1	Liposarcome	oui	firocoxib 8 mg/kg/j 31 j	cyclophosphamide ¹ + doxycycline ²
2	Carcinome nasal	non	firocoxib 5 mg/kg/j 62 j	
3	Adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal métastasé	oui	firocoxib 6 mg/kg/j 6 j	cyclophosphamide ¹ + doxycycline ²
			firocoxib 3 mg/kg/j 72 j	
4	Carcinome nasal	non	firocoxib 8 mg/kg/j 224 j	doxorubicine ³ + carboplatine ⁴
			firocoxib 4 mg/kg/j 132 j	
5	Ostéosarcome	oui	firocoxib 5 mg/kg/j 142 j	doxorubicine ³
6	Carcinome mammaire avec métastase nodale	oui	firocoxib 5 mg/kg/j 27 j	
7	Adénocarcinome nasal	non	firocoxib 5 mg/kg/j 80 j	doxorubicine ³
8	Ostéosarcome	oui	firocoxib 2 mg/kg/j 27 j	cyclophosphamide ¹
9	Carcinome mammaire	oui	firocoxib 5 mg/kg/j 197 j	doxorubicine ³ + carboplatine ⁵
10	Ostéosarcome	oui	firocoxib 4 mg/kg/j 294 j	cyclophosphamide ¹
			firocoxib 6 mg/kg/j 265 j	
11	Adénocarcinome mammaire métastasé	oui	firocoxib 5 mg/kg/j 21 j	
12	Carcinome parathyroïdien	oui		
13	Hémangiosarcome splénique	oui	méloxican 0,1 mg/kg/j 50 j	cyclophosphamide ¹
14	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	oui	firocoxib 4 mg/kg/j 73 j	carboplatine ⁵
15	Hémangiosarcome hépatique	oui	firocoxib 5 mg/kg/j 53 j	cyclophosphamide ¹
16	Carcinome thyroïdien avec images d'effraction vasculaire	oui		
17	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	oui	firocoxib 4 mg/kg/j 93 j	
18	Carcinome transitionnel vésical	non	firocoxib 5 mg/kg/j 63 j	carboplatine ⁵
19	Carcinome corticosurrénalien	oui		

¹10 mg/m²/j ; ²10 mg/kg/j ; ³30 mg/m² ; ⁴250 mg/m² ; ⁵300 mg/m²

Tableau 29 : Traitement inhibiteur de la COX-2

Pour 14 chiens (88%), la **tolérance digestive** de l'inhibiteur de la COX-2 a été jugée **très bonne** (tableau 30). Un épisode de troubles digestifs, ayant répondu favorablement à un traitement symptomatique, a été rapporté dans le cas n°9 et 10. Pour les 12 chiens restants, aucun trouble digestif n'a été rapporté par les propriétaires au cours du traitement.

Pour 2 chiens (13%), la **tolérance digestive** a été jugée **bonne**. L'apparition de troubles digestifs a en effet nécessité une diminution de la posologie de 50% (cas n°3 et 4). Aucun trouble digestif n'a été rapporté au cours du traitement après cette diminution.

Pour 13 chiens (81%), un suivi de la fonction **rénale** a également été réalisé. Pour 11 de ces chiens (**85%**), la **tolérance rénale** a été jugée **très bonne** (tableau 30). Concernant ces 11 chiens, les valeurs de la créatinine plasmatique mesurées au cours du traitement ont toujours été conformes à l'intervalle de référence de l'espèce canine. La plus forte augmentation de la créatinine plasmatique n'a pas excédé 30% de la valeur initiale.

Dans le cas n°8, le traitement a été stoppé suite à une hausse légère (15%) de la créatinine plasmatique car l'animal souffrait déjà d'une insuffisance rénale chronique au moment de la mise en place du traitement. Dans le cas n°18, l'augmentation de la créatinine plasmatique est à mettre en relation avec la progression du carcinome vésical à cellules transitionnelles dans la région du trigone qui a aboutit à une hydronéphrose sévère bilatérale.

Cas (n°)	Type tumoral	Chirurgie	AINS	Association	Tolérance digestive	Créatininémie [44-133 µmol.L ⁻¹] avant vs au cours du traitement
1	Liposarcome	oui	firocoxib 8 mg/kg/j 31 j	CM	très bonne	51,7 vs 48,2
2	Carcinome nasal	non	firocoxib 5 mg/kg/j 62 j		très bonne	72,1 vs 67
3	Adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal métastasé	oui	firocoxib 6 mg/kg/j 6 j firocoxib 3 mg/kg/j 72 j	CM	bonne (troubles digestifs)	87,2 vs 87,1-87
4	Carcinome nasal	non	firocoxib 8 mg/kg/j 224 j firocoxib 4 mg/kg/j 132 j	CC	bonne (troubles digestifs)	76,9 vs 77,4-45,7-64,8
5	Ostéosarcome	oui	firocoxib 5 mg/kg/j 142 j	CC	très bonne	71,3 vs 83,1-75,1
6	Carcinome mammaire avec métastase nodale	oui	firocoxib 5 mg/kg/j 27 j		très bonne	75,8 vs ND
7	Adénocarcinome nasal	non	firocoxib 5 mg/kg/j 80 j	CC	très bonne	ND vs 61,6-61,2-60,9-57,8
8	Ostéosarcome	oui	firocoxib 2 mg/kg/j 27 j	CM	très bonne	275,5 vs 316,8
9	Carcinome mammaire	oui	firocoxib 5 mg/kg/j 197 j	CC	très bonne (troubles digestifs x1)	85,4 vs 83,9-98,3-91-97,7-108,4-92,6-94-91,9
10	Ostéosarcome	oui	firocoxib 4 mg/kg/j 294 j firocoxib 6 mg/kg/j 265 j	CM	très bonne (troubles digestifs x 1)	61 vs 67-67,5-73,8-73,7-77,9-64,6
11	Adénocarcinome mammaire métastasé	oui	firocoxib 5 mg/kg/j 21 j		très bonne	56,3 vs ND
12	Carcinome parathyroïdien	oui				
13	Hémangiosarcome splénique	oui	méloxicam 0,1 mg/kg/j 50 j	CM	très bonne	70,2 vs 75,5-77,4
14	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	oui	firocoxib 4 mg/kg/j 73 j	CC	très bonne	114,5 vs 105,7-108,7-108,1
15	Hémangiosarcome hépatique	oui	firocoxib 5 mg/kg/j 53 j	CM	très bonne	78,3 vs 102,9
16	Carcinome thyroïdien avec images d'effraction vasculaire	oui				
17	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	oui	firocoxib 4 mg/kg/j 93 j		très bonne	53,6 vs 51,8
18	Carcinome transitionnel vésical	non	firocoxib 5 mg/kg/j 63 j	CC	très bonne	79,1 vs 364,6
19	Carcinome corticosurrénalien	oui				

CC : chimiothérapie conventionnelle ; CM : chimiothérapie métronomique ; ND : non disponible

Tableau 30 : Tolérance du traitement inhibiteur de la COX-2

2. Evolution clinique et traitement inhibiteur de la COX-2

Un inhibiteur de la COX-2 a été administré à 16 chiens (84%). Lorsque la lésion tumorale était accessible cliniquement (12/19), chaque cas a été répertorié dans une catégorie faisant référence à l'évolution clinique **suyant la mise en place** de l'inhibiteur (tableau 31). Lorsque la lésion tumorale n'était pas accessible cliniquement (4/19), chaque cas a été répertorié dans une catégorie selon d'autres critères cliniques et paracliniques (tableau 31).

Concernant les 3 chiens pour lesquels un inhibiteur de la COX-2 n'a pas été administré, chaque cas a été répertorié dans une catégorie faisant référence à l'évolution clinique **post-chirurgicale** (tableau 31).

Dans les **carcinomes mammaires** et **nasaux** et les **ostéosarcomes**, des résultats encourageants ont été obtenus lorsqu'un inhibiteur de la COX-2 était administré dans les **2 mois** suivant la chirurgie ou le diagnostic (tableau 31). Compte tenu des effectifs restreints par type tumoral, cette étude préliminaire n'a pas permis de conclure sur l'efficacité clinique des inhibiteurs de la COX-2 dans le traitement des tumeurs canines.

Cas (n°)	Type tumoral	Chirurgie	AINS	Durée ¹ (j)	Délai ² (j)	Durée de vie ³ (j)	Evolution clinique
1	Liposarcome	oui	firocoxib	31	1149	34	P à 15 j et à 30 j (mort)
2	Carcinome nasal	non	firocoxib	62	375	62	S à 15 j P à 45 j et à 60 j (mort)
3	Adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal métastasé	oui	firocoxib	78	297	155	S à 30 j et à 70 j (arrêt du traitement)
4	Carcinome nasal	non	firocoxib	356	0	356	RP à 30 j S à 5 m, à 6 m et à 8 m P à 9 m et à 11 m (mort)
5	Ostéosarcome	oui	firocoxib	142	31	> 170	RC à 15 j, à 30 j et à 45 j P à 60 j et à 120 j (arrêt du traitement)
6	Carcinome mammaire avec métastase nodale	oui	firocoxib	27	30	> 30	RC à 30 j (arrêt du suivi)
7	Adénocarcinome nasal	non	firocoxib	80	7	80	S à 21 j et à 60 j (mort cause autre)
8	Ostéosarcome	oui	firocoxib	27	326	258	RC à 30 j (arrêt du traitement)
9	Carcinome mammaire	oui	firocoxib	197	32	> 200	RC à 4 m, à 5 m et à 6 m (arrêt du traitement)
10	Ostéosarcome	oui	firocoxib	559	56	> 550	RC à 1 m, à 4 m, à 6 m, à 10 m, à 13 m et à 18 m (suivi en cours)
11	Adénocarcinome mammaire métastasé	oui	firocoxib	21	0	31	S à 20 j (mort)
12	Carcinome parathyroïdien	oui				> 365	RC à 17 mois (suivi en cours)
13	Hémangiosarcome splénique	oui	méloxicam	50	12	85	RC à 15 j et à 45 j (mort)
14	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	oui	firocoxib	73	24	> 70	P à 70 j (arrêt du suivi)
15	Hémangiosarcome hépatique	oui	firocoxib	53	87	53	P à 30 j et à 60 j (mort)
16	Carcinome thyroïdien avec images d'effraction vasculaire	oui				> 365	RP à 21 j P à 3 m S à 7 P à 11 m, à 12 m et à 16 m (suivi en cours)
17	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	oui	firocoxib	93	33	> 500	RC à 15 j P à 12 m (arrêt du traitement)
18	Carcinome transitionnel vésical	non	firocoxib	63	12	63	P à 2 m (mort)
19	Carcinome corticosurrénalien	oui				> 365	RC à 9 m (arrêt du suivi)

RC : rémission complète ; RP : rémission partielle ; S : stabilisation ; P : progression ; ND : non disponible ; j : jours ; m : mois

¹durée du traitement ; ²délai entre la mise en place du traitement et la chirurgie (ou le diagnostic en l'absence de chirurgie)

³durée de vie à partir de la mise en place du traitement (ou de la chirurgie en l'absence de traitement)

Tableau 31 : Evolution clinique et traitement inhibiteur de la COX-2

3. Potentiel métastatique et récurrence locale

Un bilan d'extension métastatique au moment du diagnostic a été réalisé pour 16 chiens (84%) (tableau 32). Afin d'évaluer le développement de métastases au cours du suivi, au moins un bilan d'extension après le diagnostic a pu être réalisé pour 14 chiens (75%).

Lorsque l'exérèse chirurgicale de la tumeur primitive a été réalisée (15/19), la survenue d'une récurrence locale a été évaluée pour 10 chiens (67%) (tableau 32). Dans les ostéosarcomes et l'hémangiosarcome splénique, la récurrence locale a été jugée non évaluable.

Cas (n°)	Type tumoral	Présence de métastases ¹	Développement de métastases ²	Récurrence locale
1	Liposarcome	non	non à 24 mois	oui
2	Carcinome nasal moyennement différencié	ND	ND	
3	Métastase nodale d'un adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal	oui	oui	oui
4	Carcinome nasal peu différencié	non	non à 6 mois	
5	Ostéosarcome chondroblastique	non	oui	
6	Carcinome mammaire d'évolution anaplasique avec métastase nodale	non	non à 1 mois	non à 1 mois
7	Adénocarcinome nasal bien différencié	non	ND	
8	Ostéosarcome ostéoblastique productif	non	non à 9 mois	
9	Carcinome mammaire basaloïde infiltrant	non	non à 6 mois	non à 6 mois
10	Ostéosarcome	non	non à 18 mois	
11	Métastase nodale d'un adénocarcinome mammaire peu différencié	non	oui	ND
12	Carcinome parathyroïdien	non	non à 17 mois	non à 17 mois
13	Hémangiosarcome splénique	non	ND	
14	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	ND	ND	oui
15	Hémangiosarcome hépatique	non	oui	non à 1 mois
16	Carcinome thyroïdien	oui	oui	non à 16 mois
17	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	non	oui	non à 18 mois
18	Carcinome transitionnel vésical	ND	ND	
19	Carcinome corticosurrénalien	non	non à 9 mois	non à 9 mois

¹au moment du diagnostic ; ²au cours du suivi ; ND : non disponible

Tableau 32 : Potentiel métastatique et récurrence locale

4. Durée de vie

7 chiens (41%) sont morts spontanément ou ont été euthanasiés à cause de leur processus tumoral. 2 chiens (12%) sont morts d'autres causes parfaitement identifiées et ne présentaient aucune évidence de récurrence locale ou d'extension métastatique. 5 chiens (29%) étaient encore en vie à la fin de l'étude, soit plus de 12 mois après la chirurgie (tableau 33).

Cas (n°)	Type tumoral	Chirurgie	Traitement médical	Durée de vie (j)	Cause de la mort
1	Liposarcome	oui	CM + AINS	1183	processus tumoral
2	Carcinome nasal	non	AINS	437	processus tumoral
3	Adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal métastasé	oui	CC + CM + AINS	452	processus tumoral
4	Carcinome nasal	non	CC + AINS	356	processus tumoral
5	Ostéosarcome	oui	CC + AINS	> 200	ND
6	Carcinome mammaire avec métastase nodale	oui	AINS	> 60	ND
7	Adénocarcinome nasal	non	CC + AINS	87	SDTE
8	Ostéosarcome	oui	CC + CM + AINS	584	méningiome
9	Carcinome mammaire	oui	CC + AINS	> 230	ND
10	Ostéosarcome	oui	CM + AINS	> 600	
11	Adénocarcinome mammaire métastasé	oui	AINS	31	processus tumoral
12	Carcinome parathyroïdien	oui		> 365	
13	Hémangiosarcome splénique	oui	CM + AINS	97	ND
14	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	oui	CC + AINS	> 90	ND
15	Hémangiosarcome hépatique	oui	CC + CM + AINS	140	processus tumoral
16	Carcinome thyroïdien avec images d'effraction vasculaire	oui	CC	> 365	
17	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	oui	AINS	> 580	
18	Carcinome transitionnel vésical	non	CC + AINS	75	processus tumoral
19	Carcinome corticosurrénalien	oui		> 365	

en vie à la fin de l'étude

CC : chimiothérapie conventionnelle ; CM : chimiothérapie métronomique ; AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien ; j : jours
 ND : non disponible ; SDTE : syndrome dilatation-torsion de l'estomac

Tableau 33 : Durée de vie

III. DISCUSSION

A. Limites et reproductibilité de la méthode

1. Echantillonnage

Bien qu'il s'agisse d'une étude préliminaire, le nombre de cas retenus peut paraître limité par rapport aux études qui ont été présentées dans la première partie. La faiblesse relative de notre échantillon révèle les difficultés auxquelles nous avons été confrontés :

- la nécessité de disposer d'un prélèvement tissulaire tumoral **exploitable d'un point de vue technique** et dont le diagnostic histologique n'était pas **ambigu**
- la volonté de disposer de cas ayant fait l'objet d'un **traitement inhibiteur de la COX-2** et dont le suivi clinique était disponible de manière **rétrospective**
- la volonté de disposer pour chaque animal d'un suivi clinique d'au moins **six mois** suivant l'exérèse chirurgicale de la tumeur primitive ou la mise en place d'un traitement médical

2. Détection immunohistochimique de la COX-2

La mise en évidence immunohistochimique de la COX-2 sur des coupes tissulaires de prélèvements tumoraux apparaît comme une méthode de réalisation technique relativement simple qui peut être utilisée en **pratique courante de laboratoire de diagnostic**. Elle est en effet réalisable sur des prélèvements fixés selon les protocoles standard et destinés à la réalisation de coupes histologiques en vue d'**examen histopathologique**. Cette mise en évidence de la COX-2 s'effectue par ailleurs dans un contexte tissulaire où les caractéristiques morphologiques du tissu et des cellules tumorales sont **préservées**.

La mise en œuvre d'une réaction immunohistochimique doit toutefois suivre un protocole dont les paramètres doivent être impérativement **standardisés** afin d'en assurer la **qualité** et la **reproductibilité**. Plusieurs facteurs sont en effet susceptibles d'intervenir dans la réactivité immunohistochimique : les méthodes de fixation et d'inclusion des prélèvements (nature du fixateur, durée de fixation...), les méthodes de traitement préalables à la réaction immunohistochimique (traitement thermique, digestion protéolytique...) et les différentes étapes de la réaction immunohistochimique (nature et dilution de l'anticorps primaire, technique d'amplification et de révélation...). La technique d'immunodétection que nous avons mise au point, a nécessité plusieurs essais méthodologiques préalables avant de conduire à des résultats satisfaisants. Le protocole que nous proposons nous a donné toutes les garanties de qualité et de reproductibilité souhaitables. Il est présenté en annexe 2.

En médecine vétérinaire, les techniques de **décalcification** des prélèvements font appel à des produits à base d'acide formique ou d'acide acétique. Nous avons constaté **l'absence totale** d'immunoréactivité anti-COX-2 dans les prélèvements ayant été soumis à un processus de décalcification (cas n°5, 8 et 10). Un tel phénomène n'a rien d'inattendu dans la mesure où l'on a déjà montré un effet **délétère** et **irréversible** des acides faibles sur les épitopes antigéniques¹¹⁴. L'absence d'immunoréactivité dans 5 prélèvements n'ayant pas été soumis à un processus de décalcification n'a pu être interprétée (cas n°1, 4, 12, 13 et 16). L'absence totale de marquage ne nous permet en effet pas de distinguer une absence d'expression tumorale de la COX-2 d'un défaut lié à la technique immunohistochimique. S'il s'agissait de la technique, la méthode de **fixation** du prélèvement ou la technique de démasquage antigénique pourraient être impliquées.

La mise en évidence d'un marquage immunohistochimique anti-COX-2 au sein de cellules **non tumorales** et l'absence de bruit de fond nous ont permis de conclure sur la **spécificité** du marquage obtenu. Une détection de la COX-2 par Western blot aurait pu être envisagée afin de confirmer l'absence d'expression tumorale de la COX-2 mise en évidence dans 4 prélèvements (cas n°1, 2 et 14).

3. Evaluation du marquage immunohistochimique anti-COX-2

Comme cela a été évoqué dans la revue bibliographique, l'évaluation du marquage immunohistochimique obtenu est très variable d'une étude à l'autre.

Dans cette étude préliminaire, nous avons fait le choix d'une méthode reposant sur un **score immunohistochimique** obtenu en combinant l'évaluation de la **proportion** de cellules tumorales marquées et l'évaluation de l'**intensité** du marquage. Cette méthode a été adoptée

car son échelle de notation permettait de décrire et d'évaluer **sans ambiguïté** la proportion de cellules tumorales marquées. Comparativement aux études ayant utilisé cette méthode, les résultats obtenus étaient **similaires à inférieurs**, qu'il s'agisse de la proportion de cellules tumorales marquées ou de l'intensité du marquage^{127,133,150,152,153}. Ces études ont cependant concerné le plus souvent des types tumoraux qui n'ont pas été étudiés ici.

B. Traitement inhibiteur de la COX-2 et tolérance

Dans cette étude préliminaire, la tolérance du traitement inhibiteur de la COX-2 a été jugée très bonne dans la majorité des cas (85%), en monothérapie ou en association avec une chimiothérapie conventionnelle ou métronomique.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans une étude clinique sur 60 chiens atteints de tumeurs épithéliales et mésenchymateuses¹⁰⁶. Cette étude a en effet montré la bonne tolérance au long terme du firocoxib, utilisé seul ou en association avec des agents de chimiothérapie conventionnelle. Des résultats équivalents ont également été obtenus dans une étude préliminaire sur 7 chiens atteints de tumeurs¹⁰⁷.

C. Expression tumorale de la COX-2 et caractéristiques histologiques

1. Expression tumorale de la COX-2 et type tumoral

Dans cette étude préliminaire, les types tumoraux qui ont montré une immunoréactivité anti-COX-2 sont identiques à ceux mis en évidence par les études sur l'expression de la COX-2 dans les tumeurs canines (tableau 34). On note en effet une immunoréactivité **forte** (score ≥ 6) dans un **carcinome mammaire** et un **carcinome épidermoïde cutané** qui sont deux types tumoraux pour lesquels une surexpression de la COX-2 a été rapportée à plusieurs reprises.

Une expression de la COX-2 a également été mise en évidence dans un **carcinome corticosurrénalien** et un **hémangiosarcome** (tableau 34). Aucune étude publiée n'a pour le moment mis en évidence l'expression de la COX-2 dans les hémangiosarcomes tandis que les carcinomes corticosurrénaux n'ont pas encore fait l'objet d'études publiées.

Type tumoral	Marquage anti-COX-2	Score IHC
Carcinomes mammaires	3/4	1 - 2 - 6
Tumeurs nasales épithéliales	1/2	3
Carcinome épidermoïde cutané	1/1	6
Carcinome thyroïdien et parathyroïdien	0/2	
Carcinome corticosurrénalien	1/1	2
Carcinome transitionnel vésical	1/1	3
Adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal	1/1	1
Ostéosarcomes	0/3	
Hémangiosarcomes	1/2	2
Liposarcome	0/1	0

absence de réactivité anti-COX-2

IHC : immunohistochimique

Tableau 34 : Marquage immunohistochimique anti-COX-2 et type tumoral

2. Expression tumorale de la COX-2 et type histologique

Dans les **carcinomes mammaires canins**, plusieurs études ont montré que certains **types histologiques** exprimaient la COX-2 à des niveaux supérieurs parmi lesquels les carcinomes tubulo-papillaires, anaplasiques, inflammatoires, épidermoïdes et les carcinosarcomes^{26,64,150,151}.

Dans cette étude préliminaire, une expression **faible à modérée** de la COX-2 a été mise en évidence dans des carcinomes mammaires **tubulo-papillaire, basaloïde et tubulo-trabéculaire** (tableau 35). Aucune immunoréactivité tumorale anti-COX-2 n'a cependant été mise en évidence dans un comédocarcinome mammaire (cas n°14).

Cas (n°)	Type tumoral	Score IHC
6	Carcinome mammaire tubulo-papillaire complexe d'évolution anaplasique	3
9	Carcinome mammaire basaloïde infiltrant	6
11	Métastase nodale d'un adénocarcinome mammaire tubulo-trabéculaire peu différencié	2
14	Comédocarcinome mammaire	0

IHC : immunohistochimique

Tableau 35 : Expression tumorale de la COX-2 et carcinomes mammaires

Le type histologique est rapporté comme étant un facteur **pronostique** dans les tumeurs nasales canines²⁰¹. Une étude a en effet montré que les **carcinomes épidermoïdes, anaplasiques et indifférenciés** étaient associés à une durée de vie plus courte que les **sarcomes**². Adams et al. ont également montré que les chiens atteints de carcinomes épidermoïdes ou indifférenciés avaient une durée de vie significativement plus courte que ceux atteints d'adénocarcinomes ou de sarcomes nasaux (6 mois vs 12 et 11,2 mois)³. Enfin, Théon et al.¹⁸⁶ ont montré que les carcinomes nasaux étaient associés à un pronostic moins bon que les sarcomes nasaux.

Dans cette étude préliminaire, une expression tumorale de la COX-2 a été mise en évidence dans un **carcinome nasal** (tableau 36). Il serait intéressant d'étudier l'expression de la COX-2 dans des sarcomes nasaux afin de déterminer s'il existe également une corrélation entre le type histologique et l'expression de la COX-2 dans les tumeurs nasales canines.

Cas (n°)	Type tumoral	Score IHC
2	Carcinome nasal moyennement différencié	0
4	Carcinome nasal peu différencié	
7	Adénocarcinome nasal bien différencié	3

absence de réactivité anti-COX-2

IHC : immunohistochimique

Tableau 36 : Expression tumorale de la COX-2 et carcinomes nasaux

D. Valeur pronostique et prédictive de l'expression tumorale de la COX-2

Dans cette étude, même si cela n'était pas l'objectif premier, nous avons tenté d'étudier la valeur **prédictive** de l'expression tumorale de la COX-2 en évaluant sa relation avec l'évolution clinique suivant la mise en place d'un traitement inhibiteur de la COX-2.

Nous avons aussi tenté d'étudier sa valeur **pronostique** en évaluant sa relation avec deux données anatomo-cliniques : le potentiel métastatique et la survenue de récurrence locale.

1. Expression tumorale de la COX-2 et évolution clinique

Compte tenu des effectifs restreints par type tumoral, cette étude préliminaire n'a pas permis de conclure sur l'efficacité clinique des inhibiteurs de la COX-2. La relation entre l'expression tumorale de la COX-2 et l'évolution clinique suivant la mise en place d'un traitement inhibiteur de la COX-2 n'a donc pu être évaluée (tableau 37). Cependant, ces résultats préliminaires nous amènent à penser qu'il est nécessaire de **cibler** les types tumoraux qui feront l'objet d'études prospectives sur la valeur prédictive de l'expression de la COX-2.

Les **carcinomes mammaires, nasaux, vésicaux** et les carcinomes **épidermoïdes** sont les types tumoraux qui expriment le plus la COX-2 (score IHC ≥ 3) et ceux qui ont déjà fait l'objet d'études cliniques sur l'effet antitumoral des inhibiteurs de la COX-2. Il nous semble donc intéressant d'étudier la valeur prédictive de l'expression de la COX-2 dans ces types tumoraux.

A l'heure actuelle, une étude publiée s'est intéressée à la valeur **prédictive** de l'expression tumorale de la COX-2 dans les carcinomes vésicaux à cellules transitionnelles¹³⁰. Dans cette étude, l'expression de la COX-2 n'a pas permis d'évaluer la réponse tumorale à un **traitement inhibiteur de la COX-2**. D'autres études cliniques restent nécessaires avant de conclure sur la valeur prédictive de l'expression tumorale de la COX-2.

Cas (n°)	Type tumoral	Score IHC	Chirurgie	AINS	Evolution clinique	Délai ¹ (j)	Durée de vie ² (j)
1	Liposarcome	0	oui	firocoxib	P à 15 j et à 30 j (mort)	1149	34
2	Carcinome nasal moyennement différencié	0	non	firocoxib	S à 15 j P à 45 j et à 60 j (mort)	375	62
3	Métastase nodale d'un adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal	1	oui	firocoxib	S à 30 j et à 70 j (arrêt du traitement)	297	155
4	Carcinome nasal peu différencié		non	firocoxib	RP à 30 j S à 5 m, à 6 m et à 8 m P à 9 m et à 11 m (mort)	0	356
5	Ostéosarcome chondroblastique		oui	firocoxib	RC à 15 j, à 30 j et à 45 j P à 60 j et à 120 j (arrêt du traitement)	31	> 170
6	Carcinome mammaire d'évolution anaplasique avec métastase nodale	3	oui	firocoxib	RC à 30 j (arrêt du suivi)	30	> 30
7	Adénocarcinome nasal bien différencié	3	non	firocoxib	S à 21 j et à 60 j (mort cause autre)	7	80
8	Ostéosarcome ostéoblastique productif		oui	firocoxib	RC à 30 j (arrêt du traitement)	326	258
9	Carcinome mammaire basaloïde infiltrant	6	oui	firocoxib	RC à 4 m, à 5 m et à 6 m (arrêt du traitement)	32	> 200
10	Ostéosarcome		oui	firocoxib	RC à 1 m, à 4 m, à 6 m, à 10 m, à 13 m et à 18 m (suivi en cours)	56	> 550
11	Métastase nodale d'un adénocarcinome mammaire peu différencié	2	oui	firocoxib	S à 20 j (mort)	0	31
12	Carcinome parathyroïdien		oui		RC à 17 mois (suivi en cours)		> 365
13	Hémangiosarcome splénique		oui	méloxicam	RC à 15 j et à 45 j (mort)	12	85
14	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	0	oui	firocoxib	P à 70 j (arrêt du suivi)	24	> 70
15	Hémangiosarcome hépatique	2	oui	firocoxib	P à 30 j et à 60 j (mort)	87	53
16	Carcinome thyroïdien		oui		RP à 21 j P à 3 m S à 7 P à 11 m, à 12 m et à 16 m (suivi en cours)		> 365
17	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	6	oui	firocoxib	RC à 15 j P à 12 m (arrêt du traitement)	33	> 500
18	Carcinome transitionnel vésical	3	non	firocoxib	P à 2 m (mort)	12	63
19	Carcinome corticosurrénalien	2	oui		RC à 9 m (arrêt du suivi)		> 365

absence de réactivité anti-COX-2

absence de réactivité tumorale anti-COX-2

IHC : immunohistochimique ; ND : non disponible ; RC : rémission complète ; RP : rémission partielle ; S : stabilisation ; P : progression ; ND : non disponible ; j : jours ; m : mois

¹délai entre la mise en place du traitement et la chirurgie (ou le diagnostic en l'absence de chirurgie) ; ²durée de vie à partir de la mise en place du traitement (ou de la chirurgie en l'absence de traitement)

Tableau 37 : Expression tumorale de la COX-2 et évolution clinique

2. Expression tumorale de la COX-2 et potentiel métastatique

Dans l'espèce canine, le degré d'extension tumorale, aussi appelé **stade** tumoral, est considéré comme un facteur **pronostique** dans de nombreux types tumoraux incluant notamment les tumeurs mammaires, les tumeurs nasales, les carcinomes vésicaux à cellules transitionnelles et les adénocarcinomes des glandes apocrines du sac anal²⁰¹.

Dans cette étude préliminaire, la présence et le développement de métastases ne sont pas corrélés à l'expression tumorale de la COX-2 (test de Fischer exact, $p > 0,05$) (tableau 38). Concernant les tumeurs exprimant la COX-2 (score IHC > 0), on notera cependant que **4 cas sur 7** ont développé des métastases au cours du suivi. Dans les tumeurs mammaires, deux études ont par ailleurs montré que l'expression de la COX-2 était corrélée au développement de métastases au cours du suivi et à une durée de vie plus courte^{151,153}. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 39.

	Présence de métastases ¹		Développement de métastases ²	
	oui	non	oui	non
Score IHC = 0	0	1	0	1
Score IHC > 0	1	7	4	2
Totaux	1	8	4	3

¹au moment du diagnostic ; ²au cours du suivi

Tableau 38 : Expression tumorale de la COX-2 et potentiel métastatique (1)

Cas (n°)	Type tumoral	Score IHC	Présence de métastases ¹	Développement de métastases ²
1	Liposarcome	0	non	non à 24 mois
2	Carcinome nasal moyennement différencié	0	ND	ND
3	Métastase nodale d'un adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal	1	oui	oui
6	Carcinome mammaire d'évolution anaplasique avec métastase nodale	3	non	non à 1 mois
7	Adénocarcinome nasal bien différencié	3	non	ND
9	Carcinome mammaire basaloloïde infiltrant	6	non	non à 6 mois
11	Métastase nodale d'un adénocarcinome mammaire peu différencié	2	non	oui
14	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	0	ND	ND
15	Hémangiosarcome hépatique	2	non	oui
17	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	6	non	oui
18	Carcinome transitionnel vésical	3	ND	ND
19	Carcinome corticosurrénalien	2	non	non à 9 mois

absence de réactivité anti-COX-2
absence de réactivité tumorale anti-COX-2

¹au moment du diagnostic ; ²au cours du suivi ; IHC : immunohistochimique ; ND : non disponible

Tableau 39 : Expression tumorale de la COX-2 et potentiel métastatique (2)

3. Expression tumorale de la COX-2 et récurrence locale

Dans cette étude préliminaire, la survenue de récurrence locale n'est pas corrélée à l'expression tumorale de la COX-2 (test de Fischer exact, $p > 0,05$) (tableau 40). L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 41.

	Récurrence locale	
	présence	absence
Score IHC = 0	1	0
Score IHC > 0	2	3
Totaux	3	3

Tableau 40 : Expression tumorale de la COX-2 et récurrence locale (1)

Cas (n°)	Type tumoral	Score IHC	Récurrence locale
1	Liposarcome	0	oui
2	Carcinome nasal moyennement différencié	0	
3	Métastase nodale d'un adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal	1	oui
6	Carcinome mammaire d'évolution anaplasique avec métastase nodale	3	non à 1 mois
7	Adénocarcinome nasal bien différencié	3	
9	Carcinome mammaire basaloïde infiltrant	6	non à 6 mois
11	Métastase nodale d'un adénocarcinome mammaire peu différencié	2	ND
14	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	0	oui
15	Hémangiosarcome hépatique	2	non à 1 mois
17	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	6	non
18	Carcinome transitionnel vésical	3	
19	Carcinome corticosurrénalien	2	non à 9 mois

absence de réactivité anti-COX-2
absence de réactivité tumorale anti-COX-2
IHC : immunohistochimique ; ND : non disponible

Tableau 41 : Expression tumorale de la COX-2 et récurrence locale (2)

E. Perspectives

Bien qu'elle n'ait pas été envisagée dans cette étude préliminaire, la recherche de critères **architecturaux** ou **cytologiques** est une approche classique en cancérologie vétérinaire lorsque l'on souhaite indiquer le pronostic d'une tumeur.

Dans l'espèce canine, le **grade histologique** est ainsi rapporté comme un facteur **pronostique** dans plusieurs types tumoraux incluant les carcinomes mammaires, les sarcomes des tissus mous et les mastocytomes cutanés²⁰¹. Dans les carcinomes mammaires, le système de grading d'Elston et al.⁴⁰ est le plus couramment utilisé et repose sur l'évaluation de trois

critères histologiques : la **formation de tubules**, le **pléomorphisme nucléaire** et la fréquence des **mitoses** (tableau 42). En additionnant ces trois scores histologiques, on obtient le grade histologique qui évalue le degré de **différenciation tumorale** (tableau 43). Six études ont montré que cette méthode de grading avait une signification pronostique fiable^{21,25,40,53,80,154}.

Formation de tubules	Score	Pléomorphisme nucléaire	Score	Mitoses /10 CFG	Score
> 75% du prélèvement	1	Petits noyaux uniformes ou réguliers et nucléoles occasionnels	1	0 - 9	1
10 - 75%	2	Noyaux hyperchromatiques avec des variations modérées en taille et en forme ; présence de nucléoles	2	10 - 19	2
< 10%	3	Noyaux hyperchromatiques avec des variations marquées en taille et en forme ; présence d'un ou de plusieurs nucléoles proéminents	3	> 20	3

CFG : champs au fort grossissement

Tableau 42 : Critères histologiques des carcinomes mammaires canins (adapté de Withrow et al.²⁰¹)

Grade histologique	Score histologique
<i>I (faible) bien différencié</i>	3 - 5
<i>II (modéré) moyennement différencié</i>	6 - 7
<i>III (fort) peu différencié</i>	8 - 9

Tableau 43 : Grading histologique des carcinomes mammaires canins (adapté de Withrow et al.²⁰¹)

Il serait donc intéressant d'étudier la relation éventuelle entre l'expression tumorale de la COX-2 et le grade histologique dans les **carcinomes mammaires canins**. Cela permettrait à la fois d'améliorer notre compréhension du rôle de la COX-2 dans la carcinogenèse mammaire et d'étudier la valeur **pronostique** de l'immunodétection de la COX-2.

Bien que le grade histologique soit largement utilisé depuis de nombreuses années, il apparaît, dans certaines conditions, insuffisant pour indiquer avec précision le pronostic et la réponse tumorale à un traitement anticancéreux. C'est pourquoi, un grand nombre de marqueurs **moléculaires** ont été étudiés dans l'espèce canine.

Dans les tumeurs mammaires canines, trois études ont montré que l'expression du **VEGF** était corrélée à un potentiel métastatique supérieur et à une durée de vie plus courte^{117,149,155}. Dans les ostéosarcomes, une étude a également montré que la valeur sérique du VEGF avant la mise en place d'un traitement anticancéreux était corrélée à la durée de rémission¹⁸⁵. Le rôle de la COX-2 dans l'angiogenèse tumorale est par ailleurs extrêmement liée à l'induction de facteurs **pro-angiogéniques** dont le **VEGF** est plus efficace et le plus largement distribué⁴¹.

Il serait donc intéressant d'étudier les relations éventuelles entre l'expression de la COX-2 et du **VEGF** dans les **tumeurs mammaires canines** et les **ostéosarcomes canins**.

CONCLUSION

Dans l'espèce canine, l'expression de la COX-2 a été mise en évidence dans un grand nombre de types tumoraux et notamment dans les tumeurs mammaires, les carcinomes vésicaux à cellules transitionnelles, les tumeurs nasales épithéliales, les mastocytomes, les ostéosarcomes et les tumeurs mélanocytaires.

A l'heure actuelle, les études cliniques restent cependant limitées sur la valeur pronostique ou prédictive de l'expression tumorale de la COX-2. C'est dans ce contexte que se positionne notre étude préliminaire. Il s'agit avant tout d'une démarche visant à mettre au point une technique standardisée de détection immunohistochimique afin d'évaluer l'expression de la COX-2 dans des tumeurs malignes solides. Cette étude a concerné dix types tumoraux différents : sept types de tumeurs épithéliales et trois types de tumeurs mésoenchymateuses.

Une expression de la COX-2 a été mise en évidence dans un hémangiosarcome et un carcinome corticosurrénalien. Aucune étude publiée n'a pour le moment mis en évidence l'expression de la COX-2 dans les hémangiosarcomes tandis que les carcinomes corticosurrénaux n'ont pas encore fait l'objet d'études publiées. Ces résultats préliminaires suggèrent une expression tumorale de la COX-2 dans un nombre plus important de types tumoraux.

Concernant l'usage des inhibiteurs de la COX-2 dans le traitement des tumeurs canines, cette étude préliminaire a permis de confirmer leur très bonne tolérance dans la majorité des cas. Bien qu'elle ne soit pas parvenue à évaluer la valeur pronostique ou prédictive de l'expression tumorale de la COX-2, cette étude a permis de cibler les types tumoraux qui feront l'objet d'études prospectives. Les carcinomes mammaires, nasaux, vésicaux et les carcinomes épidermoïdes semblent les types tumoraux à privilégier dans l'étude de l'expression tumorale de la COX-2.

Le grade histologique et l'expression du VEGF apparaissent comme les deux éléments à cibler dans l'étude des carcinomes mammaires. Le premier ayant montré à plusieurs reprises sa valeur pronostique, le second ayant un rôle clé dans l'angiogenèse tumorale, il semble intéressant d'étudier leurs relations éventuelles avec l'expression tumorale de la COX-2.

L'immunodétection de la COX-2 pourrait ainsi apparaître comme un outil supplémentaire, disponible de manière prospective et mis en œuvre au moment du diagnostic histopathologique afin d'évaluer l'évolution clinique et la réponse tumorale au traitement.

La perspective de ce travail est l'évaluation de la pertinence de la technique immunohistochimique mise au point dans une démarche prospective. La facilité de mise en œuvre de notre protocole semble favorable à sa diffusion et donc à une telle évaluation. Nous souhaitons que notre travail puisse ainsi participer aux études cliniques qui seront amenées à évaluer la valeur pronostique et prédictive de l'expression tumorale de la COX-2 dans l'espèce canine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, Kaufmann C, Morgado-Diaz JA, Bozza PT, Viola JP (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res*, **68**, 1732-40.
2. Adams WM, Kleiter MM, Thrall DE, Klauer JM, Forrest LJ, La Due TA, Havighurst TC (2009). Prognostic significance of tumor histology and computed tomographic staging for radiation treatment response of canine nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound*, **50**, 330-5.
3. Adams WM, Withrow SJ, Walshaw R, Turrell JM, Evans SM, Walker MA, Kurzman ID (1987). Radiotherapy of malignant nasal tumors in 67 dogs. *J Am Vet Med Assoc*, **191**, 311-5.
4. AOCS The Lipid Library [en ligne]. Disponible sur : <http://lipidlibrary.aocs.org/index.html> (consulté le 10/07/2012).
5. Badowska-Kozakiewicz AM, Malicka E (2010). Expression of cyclooxygenase-2 in neoplasms of the mammary gland in bitches. *Pol J Vet Sci*, **13**, 337-42.
6. Baek SJ, Kim JS, Moore SM, Lee SH, Martinez J, Eling TE (2005). Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Mol Pharmacol*, **67**, 356-64.
7. Bardagi M, Fondevila D, Ferrer L (2012). Immunohistochemical detection of COX-2 in feline and canine actinic keratoses and cutaneous squamous cell carcinoma. *J Comp Pathol*, **146**, 11-7.
8. Belshaw Z, Constantio-Casas F, Brearley MJ, Dunning MD, Holmes MA, Dobson JM (2011). COX-2 expression and outcome in canine nasal carcinomas treated with hypofractionated radiotherapy. *Vet Comp Oncol*, **9**, 141-8.
9. Boria PA, Murry DJ, Bennett PF, Glickman NW, Snyder PW, Merkel BL, Schlittler DL, Mutsaers AJ, Thomas RM, Knapp DW (2004). Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, **224**, 388-94.
10. Borzacchiello G, Paciello O, Papparella S (2004). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in canine nasal carcinomas. *J Comp Pathol*, **131**, 70-6.
11. Borzacchiello G, Russo V, Russo M (2007). Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in canine ovarian carcinomas. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, **54**, 247-9.
12. Bottone FG, Jr., Moon Y, Kim JS, Alston-Mills B, Ishibashi M, Eling TE (2005). The anti-invasive activity of cyclooxygenase inhibitors is regulated by the transcription factor ATF3 (activating transcription factor 3). *Mol Cancer Ther*, **4**, 693-703.
13. Brunelle M, Sartin EA, Wolfe LG, Sirois J, Dore M (2006). Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Vet Pathol*, **43**, 656-66.

14. Burton JH, Mitchell L, Thamm DH, Dow SW, Biller BJ (2011). Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. *J Vet Intern Med*, **25**, 920-6.
15. Castillo Nd, Aceña C, Domingo V, Rodríguez Grau-Bassas E (2010). Firocoxib in the treatment of metastatic or inoperable breast cancer. *Argos - Informativo Veterinario*, 76-77.
16. Chan CM, Ma BB, Hui EP, Wong SC, Mo FK, Leung SF, Kam MK, Chan AT (2007). Cyclooxygenase-2 expression in advanced nasopharyngeal carcinoma--a prognostic evaluation and correlation with hypoxia inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor. *Oral Oncol*, **43**, 373-8.
17. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998). Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 681-6.
18. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13926-31.
19. Chang YW, Jakobi R, McGinty A, Foschi M, Dunn MJ, Sorokin A (2000). Cyclooxygenase 2 promotes cell survival by stimulation of dynein light chain expression and inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity. *Mol Cell Biol*, **20**, 8571-9.
20. Chwirot BW, Kuzbicki L (2007). Cyclooxygenase-2 (COX-2): first immunohistochemical marker distinguishing early cutaneous melanomas from benign melanocytic skin tumours. *Melanoma Res*, **17**, 139-45.
21. Clemente M, Perez-Alenza MD, Illera JC, Pena L (2010). Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol*, **47**, 265-74.
22. Cok SJ, Acton SJ, Morrison AR (2003). The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 36157-62.
23. Creminon C, Habib A, Maclouf J, Pradelles P, Grassi J, Frobert Y (1995). Differential measurement of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase expression in human umbilical vein endothelial cells using specific immunometric enzyme immunoassays. *Biochim Biophys Acta*, **1254**, 341-8.
24. Cuzick J, Otto F, Baron JA, Brown PH, Burn J, Greenwald P, Jankowski J, La Vecchia C, Meyskens F, Senn HJ, Thun M (2009). Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *Lancet Oncol*, **10**, 501-7.
25. de Las Mulas JM, Millan Y, Dios R (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol*, **42**, 200-12.

26. de M. Souza CH, Toledo-Piza E, Amarin R, Barboza A, Tobias KM (2009). Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Can Vet J*, **50**, 506-10.
27. De Nardi AB, Daleck CR, Souza CHM, Amarin RL, Rodaski S, Calderon C, Torres R (2005). Cyclooxygenase -2 Expression in Mammary Tumors in Dogs and its Correlation to Histologic and Biologic Behavior. *Veterinary and Comparative Oncology*, **3**, 56-57.
28. Degen GH (1990). Role of prostaglandin-H synthase in mediating genotoxic and carcinogenic effects of estrogens. *Environ Health Perspect*, **88**, 217-23.
29. Denkert C, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M, Kristiansen G, Reles A, Siegert A, Guski H, Hauptmann S (2003). Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor for disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer*, **97**, 2978-87.
30. Dias Pereira P, Lopes CC, Matos AJ, Santos M, Gartner F, Medeiros R, Lopes C (2009). COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. *J Comp Pathol*, **140**, 247-53.
31. Dickens DS, Kozielski R, Khan J, Forus A, Cripe TP (2002). Cyclooxygenase-2 expression in pediatric sarcomas. *Pediatr Dev Pathol*, **5**, 356-64.
32. Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2001). Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest*, **108**, 1657-65.
33. Dore M (2011). Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. *Vet Pathol*, **48**, 254-65.
34. Dore M, Cote LC, Mitchell A, Sirois J (1998). Expression of prostaglandin G/H synthase type 1, but not type 2, in human ovarian adenocarcinomas. *J Histochem Cytochem*, **46**, 77-84.
35. Dore M, Lanthier I, Sirois J (2003). Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, **40**, 207-12.
36. DuBois RN, Shao J, Tsujii M, Sheng H, Beauchamp RD (1996). G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res*, **56**, 733-7.
37. DuBois RN, Tsujii M, Bishop P, Awad JA, Makita K, Lanahan A (1994). Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol*, **266**, G822-7.
38. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, **107**, 1183-8.
39. Elmslie RE, Glawe P, Dow SW (2008). Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas. *J Vet Intern Med*, **22**, 1373-9.

40. Elston CW, Ellis IO (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, **19**, 403-10.
41. Ferrara N (2000). VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol*, **11**, 617-24.
42. Flory AB, LeBlanc AK (2005). The role of cyclooxygenase in carcinogenesis and anticancer therapy. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, **27**, 616-26.
43. Forones NM, Kawamura KY, Segreto HR, Artigiani Neto R, Focchi GR, Oshima CT (2008). Expression of COX-2 in stomach carcinogenesis. *J Gastrointest Cancer*, **39**, 4-10.
44. Fosslien E (2000). Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **37**, 431-502.
45. Frolich JC (1997). A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci*, **18**, 30-4.
46. Fulton AM, Ma X, Kundu N (2006). Targeting prostaglandin E EP receptors to inhibit metastasis. *Cancer Res*, **66**, 9794-7.
47. Gallo O, Masini E, Bianchi B, Bruschini L, Paglierani M, Franchi A (2002). Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*, **33**, 708-14.
48. Gardner DG (1996). Spontaneous squamous cell carcinomas of the oral region in domestic animals: a review and consideration of their relevance to human research. *Oral Dis*, **2**, 148-54.
49. Gately S (2000). The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, **19**, 19-27.
50. Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC (2010). COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep*, **62**, 233-44.
51. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR, Offerhaus GJ (1993). Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*, **328**, 1313-6.
52. Gilroy DW, Saunders MA, Sansores-Garcia L, Matijevic-Aleksic N, Wu KK (2001). Cell cycle-dependent expression of cyclooxygenase-2 in human fibroblasts. *FASEB J*, **15**, 288-90.
53. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*, **48**, 117-31.
54. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A (2009). The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, **30**, 377-86.

55. Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, Gomis RR, Manova-Todorova K, Massague J (2007). Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*, **446**, 765-70.
56. Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, DuBois RN (2003). Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res*, **63**, 906-11.
57. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H (2000). Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate*, **42**, 73-8.
58. Habib A, Creminon C, Frobert Y, Grassi J, Pradelles P, Maclouf J (1993). Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, **268**, 23448-54.
59. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA (2002). Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*, **62**, 1676-81.
60. Hanahan D, Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353-64.
61. Harris RE, Chlebowski RT, Jackson RD, Frid DJ, Ascenseo JL, Anderson G, Loar A, Rodabough RJ, White E, McTiernan A, Women's Health I (2003). Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative. *Cancer Res*, **63**, 6096-101.
62. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol*, **23**, 144-50.
63. Heller DA, Clifford CA, Goldschmidt MH, Holt DE, Manfredi MJ, Sorenmo KU (2005). Assessment of cyclooxygenase-2 expression in canine hemangiosarcoma, histiocytic sarcoma, and mast cell tumor. *Vet Pathol*, **42**, 350-3.
64. Heller DA, Clifford CA, Goldschmidt MH, Holt DE, Shofer FS, Smith A, Sorenmo KU (2005). Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Vet Pathol*, **42**, 776-80.
65. Heller DA, Fan TM, de Lorimier LP, Charney SC, Barger AM, Tannehill-Gregg SH, Rosol TJ, Wallig MA (2007). In vitro cyclooxygenase-2 protein expression and enzymatic activity in neoplastic cells. *J Vet Intern Med*, **21**, 1048-55.
66. Hermanova M, Karasek P, Nenutil R, Kyr M, Tomasek J, Baltasova I, Dite P (2009). Clinicopathological correlations of cyclooxygenase-2, MDM2, and p53 expressions in surgically resectable pancreatic invasive ductal adenocarcinoma. *Pancreas*, **38**, 565-71.
67. Hida T, Leyton J, Makheja AN, Ben-Av P, Hla T, Martinez A, Mulshine J, Malkani S, Chung P, Moody TW (1998). Non-small cell lung cancer cyclooxygenase activity and proliferation are inhibited by non-steroidal antiinflammatory drugs. *Anticancer Res*, **18**, 775-82.

68. Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T, Takahashi T (1998). Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res*, **58**, 3761-4.
69. Hla T, Neilson K (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7384-8.
70. Hong WK, Spitz MR, Lippman SM (2000). Cancer chemoprevention in the 21st century: genetics, risk modeling, and molecular targets. *J Clin Oncol*, **18**, 9S-18S.
71. Impellizeri JA, Esplin DG (2008). Expression of cyclooxygenase-2 in canine nasal carcinomas. *Vet J*, **176**, 408-10.
72. Italiano A (2011). Prognostic or predictive? It's time to get back to definitions! *J Clin Oncol*, **29**, 4718; author reply 18-9.
73. Janelle ME, Gravel A, Gosselin J, Tremblay MJ, Flamand L (2002). Activation of monocyte cyclooxygenase-2 gene expression by human herpesvirus 6. Role for cyclic AMP-responsive element-binding protein and activator protein-1. *J Biol Chem*, **277**, 30665-74.
74. Jankovsky JM, Newkirk KM, Ilha MR, Newman SJ (2013). COX-2 and c-kit expression in canine gliomas. *Vet Comp Oncol*, **11**, 63-69.
75. Jayr C (2004). [Analgesic effects of cyclooxygenase 2 inhibitors]. *Bull Cancer*, **91 Spec No**, S125-31.
76. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1993). Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, **268**, 9049-54.
77. Jouzeau JY, Daouphars M, Benani A, Netter P (2004). [Pharmacology and classification of cyclooxygenase inhibitors]. *Gastroenterol Clin Biol*, **28 Spec No 3**, C7-17.
78. Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Kawai N, Yasumaru M, Kimura A, Komori M, Irie T, Miyoshi E, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Horii M (2002). Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res*, **62**, 1567-72.
79. Kambayashi T, Alexander HR, Fong M, Strassmann G (1995). Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol*, **154**, 3383-90.
80. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A (2005). Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol*, **133**, 246-52.
81. Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S (1995). Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res*, **55**, 2556-9.

82. Kerbel RS, Kamen BA (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, **4**, 423-36.
83. Khan KN, Knapp DW, Denicola DB, Harris RK (2000). Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am J Vet Res*, **61**, 478-81.
84. Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D, Knapp DW (2001). Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol*, **38**, 116-9.
85. Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, Alden CL (1998). Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol*, **26**, 612-20.
86. Kishi K, Petersen S, Petersen C, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ, Milas L (2000). Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res*, **60**, 1326-31.
87. Kleiter M, Malarkey DE, Ruslander DE, Thrall DE (2004). Expression of cyclooxygenase-2 in canine epithelial nasal tumors. *Vet Radiol Ultrasound*, **45**, 255-60.
88. Knapp DW, Henry CJ, Widmer WR, Tan KM, Moore GE, Ramos-Vara JA, Lucroy MD, Greenberg CB, Greene SN, Abbo AH, Hanson PD, Alva R, Bonney PL (2013). Randomized trial of cisplatin versus firocoxib versus cisplatin/firocoxib in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med*, **27**, 126-33.
89. Knapp DW, Richardson RC, Chan TC, Bottoms GD, Widmer WR, DeNicola DB, Teclaw R, Bonney PL, Kuczek T (1994). Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med*, **8**, 273-8.
90. Knottenbelt C, Mellor D, Nixon C, Thompson H, Argyle DJ (2006). Cohort study of COX-1 and COX-2 expression in canine rectal and bladder tumours. *J Small Anim Pract*, **47**, 196-200.
91. Ko SC, Chapple KS, Hawcroft G, Coletta PL, Markham AF, Hull MA (2002). Paracrine cyclooxygenase-2-mediated signalling by macrophages promotes tumorigenic progression of intestinal epithelial cells. *Oncogene*, **21**, 7175-86.
92. Kolev Y, Uetake H, Iida S, Ishikawa T, Kawano T, Sugihara K (2007). Prognostic significance of VEGF expression in correlation with COX-2, microvessel density, and clinicopathological characteristics in human gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol*, **14**, 2738-47.
93. Kraegel SA, Madewell BR (2000). Tumors of the skin. In *Textbook of Veterinary Internal Medicine Diseases of the Dog and Cat*. 5e édition. Philadelphia: WB Saunders, p. 524-28.
94. Kulp SK, Yang YT, Hung CC, Chen KF, Lai JP, Tseng PH, Fowble JW, Ward PJ, Chen CS (2004). 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 1444-51.

95. L'Eplattenier HF, Lai CL, van den Ham R, Mol J, van Sluijs F, Teske E (2007). Regulation of COX-2 expression in canine prostate carcinoma: increased COX-2 expression is not related to inflammation. *J Vet Intern Med*, **21**, 776-82.
96. Lana S, U'Ren L, Plaza S, Elmslie R, Gustafson D, Morley P, Dow S (2007). Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs. *J Vet Intern Med*, **21**, 764-9.
97. Laprie C, Abadie J, Amardeilh MF, Net JL, Lagadic M, Delverdier M (2001). MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet Dermatol*, **12**, 139-47.
98. Lavalley GE, Bertagnolli AC, Tavares WL, Cassali GD (2009). Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol*, **46**, 1275-80.
99. Lee JY, Tanabe S, Shimohira H, Kobayashi Y, Oomachi T, Azuma S, Ogihara K, Inokuma H (2007). Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma. *Res Vet Sci*, **83**, 210-6.
100. Léon-Artozqui (2008). Progresos en el tratamiento del dolor con Previcox® (firocoxib) : historia y datos clínicos. *Consultation*, **16**, 41-5.
101. Léon-Artozqui M (2008). Firocoxib, últimos avances en oncología [en ligne]. Disponible sur : http://www.cvsf.pro/articulos/Merial/Separata_Firocoxib_y_oncologia.pdf (consulté le 05/04/2013).
102. Liao Z, Mason KA, Milas L (2007). Cyclo-oxygenase-2 and its inhibition in cancer: is there a role ? *Drugs*, **67**, 821-45.
103. Liou JY, Aleksic N, Chen SF, Han TJ, Shyue SK, Wu KK (2005). Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance. *Exp Cell Res*, **306**, 75-84.
104. Liou JY, Deng WG, Gilroy DW, Shyue SK, Wu KK (2001). Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 34975-82.
105. Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T (2001). Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem*, **276**, 18563-9.
106. Lloret A (2007). Resultados preliminares del uso de firocoxib en perros con neoplasias malignas. In *42e Congreso Nacional AVEPA*, 19-21 October 2007, Barcelona, Spain.
107. Lloret A (2007). Use of a veterinary coxib, firocoxib, in canine cancer patients : preliminary results. In *17th ECVIM-CA Congress and 9th ESVCP Congress*, 13-15 September 2007, Budapest, Hungary.

108. Mann M, Sheng H, Shao J, Williams CS, Pisacane PI, Sliwkowski MX, DuBois RN (2001). Targeting cyclooxygenase 2 and HER-2/neu pathways inhibits colorectal carcinoma growth. *Gastroenterology*, **120**, 1713-9.
109. Manson MM, Holloway KA, Howells LM, Hudson EA, Plummer SM, Squires MS, Prigent SA (2000). Modulation of signal-transduction pathways by chemopreventive agents. *Biochem Soc Trans*, **28**, 7-12.
110. Martinez CM, Penafiel-Verdu C, Vilafranca M, Ramirez G, Mendez-Gallego M, Buendia AJ, Sanchez J (2011). Cyclooxygenase-2 expression is related with localization, proliferation, and overall survival in canine melanocytic neoplasms. *Vet Pathol*, **48**, 1204-11.
111. Masmoudi A, Chevalier TL, Sabatier L, Soria JC (2004). [Cyclooxygenase 2 inhibitors and cancer chemoprevention]. *Bull Cancer*, **91 Suppl 2**, S77-84.
112. Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, Ohno S, Shibakita M, Kinugasa S, Yoshimura H, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N (2000). Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, **6**, 4064-8.
113. McEntee MF, Cates JM, Neilsen N (2002). Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. *Vet Pathol*, **39**, 428-36.
114. McNicol AM, Richmond JA (1998). Optimizing immunohistochemistry: antigen retrieval and signal amplification. *Histopathology*, **32**, 97-103.
115. Miao R, Liu N, Wang Y, Li L, Yu X, Jiang Y, Li J (2008). Coexpression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in gastrointestinal stromal tumor: possible relations to pathological parameters and clinical behavior. *Hepatogastroenterology*, **55**, 2012-5.
116. Millanta F, Asproni P, Cancedda S, Vignoli M, Bacci B, Poli A (2012). Immunohistochemical Expression of COX-2, mPGES and EP2 Receptor in Normal and Reactive Canine Bone and in Canine Osteosarcoma. *J Comp Pathol*, **147**, 153-60.
117. Millanta F, Citi S, Della Santa D, Porciani M, Poli A (2006). COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res Treat*, **98**, 115-20.
118. Mohammed SI, Bennett PF, Craig BA, Glickman NW, Mutsaers AJ, Snyder PW, Widmer WR, DeGortari AE, Bonney PL, Knapp DW (2002). Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Res*, **62**, 356-8.
119. Mohammed SI, Dhawan D, Abraham S, Snyder PW, Waters DJ, Craig BA, Lu M, Wu L, Zheng R, Stewart J, Knapp DW (2006). Cyclooxygenase inhibitors in urinary bladder cancer: in vitro and in vivo effects. *Mol Cancer Ther*, **5**, 329-36.
120. Mohammed SI, Khan KN, Sellers RS, Hayek MG, DeNicola DB, Wu L, Bonney PL, Knapp DW (2004). Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **70**, 479-83.

121. Mohammed SI, Knapp DW, Bostwick DG, Foster RS, Khan KN, Masferrer JL, Woerner BM, Snyder PW, Koki AT (1999). Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. *Cancer Res*, **59**, 5647-50.
122. Moon Y, Bottone FG, Jr., McEntee MF, Eling TE (2005). Suppression of tumor cell invasion by cyclooxygenase inhibitors is mediated by thrombospondin-1 via the early growth response gene Egr-1. *Mol Cancer Ther*, **4**, 1551-8.
123. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL (1995). Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem*, **270**, 10902-8.
124. Moulton JE (1990). Tumors of the skin and soft tissues. In *Tumors in Domestic Animals*. 3e édition. Los Angeles: University of California Press, p. 23.
125. Mukhopadhyay D, Houchen CW, Kennedy S, Dieckgraefe BK, Anant S (2003). Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2. *Mol Cell*, **11**, 113-26.
126. Muller-Decker K, Neufang G, Berger I, Neumann M, Marks F, Furstenberger G (2002). Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12483-8.
127. Mullins MN, Lana SE, Dernell WS, Ogilvie GK, Withrow SJ, Ehrhart EJ (2004). Cyclooxygenase-2 expression in canine appendicular osteosarcomas. *J Vet Intern Med*, **18**, 859-65.
128. Mutsaers AJ (2009). Metronomic chemotherapy. *Top Companion Anim Med*, **24**, 137-43.
129. Mutsaers AJ, Glickman NW, DeNicola DB, Widmer WR, Bonney PL, Hahn KA, Knapp DW (2002). Evaluation of treatment with doxorubicin and piroxicam or doxorubicin alone for multicentric lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, **220**, 1813-7.
130. Mutsaers AJ, Mohammed SI, DeNicola DB, Snyder PW, Glickman NW, Bennett PF, de Gortari AE, Bonney PL, Knapp DW (2005). 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 Leukot Essent Fatty Acids*, **72**, 181-6.
131. Nie D, Lamberti M, Zacharek A, Li L, Szekeres K, Tang K, Chen Y, Honn KV (2000). Thromboxane A(2) regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, **267**, 245-51.
132. Nowak M, Madej JA, Dziegiel P (2005). Immunohistochemical localization of COX2 in cells of mammary adenocarcinomas in bitches as related to tumour malignancy grade. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, **49**, 433-37.
133. Nowak M, Madej JA, Dziegiel P (2007). Intensity of COX2 expression in cells of soft tissue fibrosarcomas in dogs as related to grade of tumour malignancy. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, **51**, 275-79.

134. O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V, Young DA (1991). A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem*, **266**, 23261-7.
135. O'Connor JK, Avent J, Lee RJ, Fischbach J, Gaffney DK (2004). Cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in invasive breast cancer treated with mastectomy and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **58**, 1034-40.
136. Ogilvie GK, LaRue SM (1992). Canine and feline nasal and paranasal sinus tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **22**, 1133-44.
137. Paglia D, Dubielzig RR, Kado-Fong HK, Maggs DJ (2009). Expression of cyclooxygenase-2 in canine uveal melanocytic neoplasms. *Am J Vet Res*, **70**, 1284-90.
138. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS (2002). Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med*, **8**, 289-93.
139. Pairet M, Netter P (1999). [Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: importance and limitations]. *Therapie*, **54**, 433-45.
140. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CC, Levin ER (2002). Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J Biol Chem*, **277**, 50768-75.
141. Perez Alenza MD, Tabanera E, Pena L (2001). Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc*, **219**, 1110-4.
142. Pestili de Almeida EM, Piche C, Sirois J, Dore M (2001). Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem*, **49**, 867-75.
143. Pires I, Garcia A, Prada J, Queiroga FL (2010). COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours. *J Comp Pathol*, **143**, 142-9.
144. Poggiani SdSC, Hatayde MR, Laufer-Amorim R, Werner J (2012). Expression of cyclooxygenase-2 and Ki-67 in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma in dogs. *Open Journal of Veterinary Medicine*, **2**, 41-47.
145. Prada J, Queiroga FL, Gregorio H, Pires I (2012). Evaluation of cyclooxygenase-2 expression in canine mast cell tumours. *J Comp Pathol*, **147**, 31-6.
146. Pronovost N, Suter MM, Mueller E, Sirois J, Dore M (2004). Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic canine keratinocytes. *Vet Comp Oncol*, **2**, 222-33.
147. Pyo H, Choy H, Amorino GP, Kim JS, Cao Q, Hercules SK, DuBois RN (2001). A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, enhances the effect of radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res*, **7**, 2998-3005.

148. Pyrko P, Kardosh A, Liu YT, Soriano N, Xiong W, Chow RH, Uddin J, Petasis NA, Mircheff AK, Farley RA, Louie SG, Chen TC, Schonthal AH (2007). Calcium-activated endoplasmic reticulum stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib, a non-coxib analogue of celecoxib. *Mol Cancer Ther*, **6**, 1262-75.
149. Qiu CW, Lin DG, Wang JQ, Li CY, Deng GZ (2008). Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. *Vet Res Commun*, **32**, 463-72.
150. Queiroga FL, Alves A, Pires I, Lopes C (2007). Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol*, **136**, 177-85.
151. Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Pena L, Lopes C, Illera JC (2005). Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Res*, **25**, 4269-75.
152. Queiroga FL, Pires I, Lobo L, Lopes CS (2010). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Res Vet Sci*, **88**, 441-5.
153. Queiroga FL, Pires I, Parente M, Gregorio H, Lopes CS (2010). COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. *Vet J*, **189**, 77-82.
154. Rasotto R, Zappulli V, Castagnaro M, Goldschmidt MH (2012). A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Vet Pathol*, **49**, 330-40.
155. Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G (2002). Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, **39**, 488-93.
156. Risau W (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-4.
157. Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J (2002). Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*, **62**, 632-5.
158. Rizzo MT (2011). Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clin Chim Acta*, **412**, 671-87.
159. Rodrigues LCS, Cogliati B, Guerra JL, Dagli MLZ, Lucas SRR (2011). An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in canine multicentric lymphoma. *Anales de Veterinaria de Murcia*, **27**, 43-49.
160. Rodrigues MMP, Santis GWd, Moura VMBDD, Amorim RL (2010). COX-2 and TGF- β expression in proliferative disorders of canine prostate. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, **3**, 31-36.
161. Rodrigues S, Bruyneel E, Rodrigue CM, Shahin E, Gespach C (2004). [Cyclooxygenase 2 and carcinogenesis]. *Bull Cancer*, **91 Suppl 2**, S61-76.

162. Roels S, Tilmant K, Ducatelle R (1999). PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J Comp Pathol*, **121**, 13-24.
163. Rossmeis JH, Jr., Robertson JL, Zimmerman KL, Higgins MA, Geiger DA (2009). Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in canine intracranial meningiomas. *Vet Comp Oncol*, **7**, 173-80.
164. Rousseau S, Morrice N, Pegg M, Campbell DG, Gaestel M, Cohen P (2002). Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs. *EMBO J*, **21**, 6505-14.
165. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T (1995). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res*, **55**, 3785-9.
166. Schmidt BR, Glickman NW, DeNicola DB, de Gortari AE, Knapp DW (2001). Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, **218**, 1783-6.
167. Scuderi MR, Anfuso CD, Lupo G, Motta C, Romeo L, Guerra L, Cappellani A, Ragusa N, Cantarella G, Alberghina M (2008). Expression of Ca(2+)-independent and Ca(2+)-dependent phospholipases A(2) and cyclooxygenases in human melanocytes and malignant melanoma cell lines. *Biochim Biophys Acta*, **1781**, 635-42.
168. Sengupta S, Jang BC, Wu MT, Paik JH, Furneaux H, Hla T (2003). The RNA-binding protein HuR regulates the expression of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, **278**, 25227-33.
169. Sharma RA, Gescher A, Plastaras JP, Leuratti C, Singh R, Gallacher-Horley B, Offord E, Marnett LJ, Steward WP, Plummer SM (2001). Cyclooxygenase-2, malondialdehyde and pyrimidopurinone adducts of deoxyguanosine in human colon cells. *Carcinogenesis*, **22**, 1557-60.
170. Sharpe CR, Collet JP, McNutt M, Belzile E, Boivin JF, Hanley JA (2000). Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage. *Br J Cancer*, **83**, 112-20.
171. Sheng H, Shao J, Dubois RN (2001). K-Ras-mediated increase in cyclooxygenase 2 mRNA stability involves activation of the protein kinase B1. *Cancer Res*, **61**, 2670-5.
172. Sheng H, Williams CS, Shao J, Liang P, DuBois RN, Beauchamp RD (1998). Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, **273**, 22120-7.
173. Sinicrope FA (2006). Targeting cyclooxygenase-2 for prevention and therapy of colorectal cancer. *Mol Carcinog*, **45**, 447-54.
174. Smith SH, Goldschmidt MH, McManus PM (2002). A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol*, **39**, 651-78.

175. Sonzogni-Desautels K, Knapp DW, Sartin E, Dore M (2011). Effect of cyclooxygenase inhibitors in a xenograft model of canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*, **9**, 161-71.
176. Sorenmo KU, Goldschmidt MH, Shofer FS, Goldkamp C, Ferracone J (2004). Evaluation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression and the effect of cyclooxygenase inhibitors in canine prostatic carcinoma. *Vet Comp Oncol*, **2**, 13-23.
177. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT (2000). COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, **89**, 2637-45.
178. Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer, II, Smith WL (1998). Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem*, **273**, 9886-93.
179. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM (1976). Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc*, **35**, 1332-8.
180. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*, **342**, 1946-52.
181. Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem*, **276**, 12440-8.
182. Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ (1996). Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res*, **56**, 4424-9.
183. Subbarayan V, Sabichi AL, Llansa N, Lippman SM, Menter DG (2001). Differential expression of cyclooxygenase-2 and its regulation by tumor necrosis factor-alpha in normal and malignant prostate cells. *Cancer Res*, **61**, 2720-6.
184. Teicher BA, Korbut TT, Menon K, Holden SA, Ara G (1994). Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors as modulators of cancer therapies. *Cancer Chemother Pharmacol*, **33**, 515-22.
185. Thamm DH, O'Brien MG, Vail DM (2008). Serum vascular endothelial growth factor concentrations and postsurgical outcome in dogs with osteosarcoma. *Vet Comp Oncol*, **6**, 126-32.
186. Theon AP, Madewell BR, Harb MF, Dungworth DL (1993). Megavoltage irradiation of neoplasms of the nasal and paranasal cavities in 77 dogs. *J Am Vet Med Assoc*, **202**, 1469-75.
187. Thun MJ, Heath CW, Jr. (1995). Aspirin use and reduced risk of gastrointestinal tract cancers in the American Cancer Society prospective studies. *Prev Med*, **24**, 116-8.

188. Tomlinson J, Blikslager A (2003). Role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in gastrointestinal tract injury and repair. *J Am Vet Med Assoc*, **222**, 946-51.
189. Tremblay C, Dore M, Bochsler PN, Sirois J (1999). Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 1398-403.
190. Tripp CD, Fidel J, Anderson CL, Patrick M, Pratt C, Sellon R, Bryan JN (2011). Tolerability of metronomic administration of lomustine in dogs with cancer. *J Vet Intern Med*, **25**, 278-84.
191. Tsujii M, DuBois RN (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, **83**, 493-501.
192. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN (1997). Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3336-40.
193. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, **93**, 705-16.
194. Vane JR (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, **231**, 232-5.
195. Vascellari M, Giantin M, Capello K, Carminato A, Morello EM, Vercelli A, Granato A, Buracco P, Dacasto M, Mutinelli F (2013). Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis. *Vet Pathol*, **50**, 110-21.
196. Walder EJ (1995). Comparative aspects of nonmelanoma skin cancer. *Clin Dermatol*, **13**, 569-78.
197. Wang D, Dubois RN (2010). Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*, **10**, 181-93.
198. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Thamm DH, Hamilton E, Kiupel M (2008). Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. *BMC Vet Res*, **4**, 32.
199. Welle MM, Bley CR, Howard J, Rufenacht S (2008). Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Vet Dermatol*, **19**, 321-39.
200. Williams CS, Mann M, DuBois RN (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, **18**, 7908-16.
201. Withrow SJ (2012). *Small animal clinical oncology*. 5e édition. St Louis: Saunders Elsevier. 768 p. 978-1-4377-2362-5.
202. Wolfesberger B, Walter I, Hoelzl C, Thalhammer JG, Egerbacher M (2006). Antineoplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells. *Res Vet Sci*, **80**, 308-16.

203. Yamaguchi K, Whitlock NC, Liggett JL, Legendre AM, Fry MM, Baek SJ (2008). Molecular characterisation of canine nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1). *Vet J*, **175**, 89-95.
204. Yokoyama C, Tanabe T (1989). Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, **165**, 888-94.
205. Yu HG, Li JY, Yang YN, Luo HS, Yu JP, Meier JJ, Schrader H, Bastian A, Schmidt WE, Schmitz F (2003). Increased abundance of cyclooxygenase-2 correlates with vascular endothelial growth factor-A abundance and tumor angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Lett*, **195**, 43-51.
206. Zetter BR (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med*, **49**, 407-24.
207. Zhang X, Chen ZG, Choe MS, Lin Y, Sun SY, Wieand HS, Shin HJ, Chen A, Khuri FR, Shin DM (2005). Tumor growth inhibition by simultaneously blocking epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in a xenograft model. *Clin Cancer Res*, **11**, 6261-9.
208. Zhang XH, Huang DP, Guo GL, Chen GR, Zhang HX, Wan L, Chen SY (2008). Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer*, **8**, 4.
209. Zhu J, Huang JW, Tseng PH, Yang YT, Fowble J, Shiau CW, Shaw YJ, Kulp SK, Chen CS (2004). From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 inhibitors. *Cancer Res*, **64**, 4309-18.
210. Zuccari DAPC, Pavam MV, Terzian CB, Pereira RS, Ruiz CM, Andrade JC (2008). Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factors and clinical outcome. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **28**, 207-15.

ANNEXES

ANNEXE 1 : L'EXPRESSION DE LA COX-2 DANS LES TUMEURS CANINES

Type tumoral	(N)	COX-2 (%)	Méthode	Etude		
<i>Tumeurs épithéliales</i>		60	IHC	Queiroga et al. 2007		
		27	IHC	Queiroga et al. 2010a		
	<i>Tumeurs mammaires</i>	133	92	IHC	Badowska et al. 2010	
		70	49	IHC	Queiroga et al. 2010b	
		48	48	IHC	de Nardi et al. 2005	
		147	42	IHC	Doel et al. 2003	
		81	27	IHC	Dias Pereira et al. 2009	
			12	IHC	de M. Souza et al. 2009	
	<i>Carcinomes mammaires inflammatoires</i>	28	100	IHC	Millanta et al. 2006	
		46	100	IHC	Lavalle et al. 2009	
	<i>Carcinomes mammaires</i>	13	62	IHC	Mohammed et al. 2004	
		50	56	IHC	Heller et al. 2005a	
	<i>Carcinomes prostatiques</i>	5	100	IHC	Rodrigues et al. 2010	
		34	88	IHC	Sorenmo et al. 2004	
		48	86	IHC, WB	L'Epitamer et al. 2007	
		9	56	IHC	Mohammed et al. 2004	
	<i>Adénocarcinomes prostatiques</i>	24	75	IHC, WB	Tremblay et al. 1999	
		21	100	IHC	Khan et al. 2000	
		<i>Carcinomes à cellules transitionnelles</i>	18	100	IHC	Knotenbelt et al. 2006
			18	100	IHC	Mutsaers et al. 2005
		52	58	IHC	Lee et al. 2007	
		<i>Carcinomes épidermoïdes cutanés</i>	9	100	IHC	Bardagi et al. 2011
			10	100	IHC	Poggiani et al. 2012
		<i>Carcinomes épidermoïdes oraux</i>	26	65	IHC	Mohammed et al. 2004
		<i>Carcinomes épidermoïdes</i>	40	100	IHC, WB	Pestilli de Almeida et al. 2001
		<i>Tumeurs nasales épithéliales</i>	42	90	IHC	Belshaw et al. 2010
	15		87	IHC	Borzacchiello et al. 2004	
21	81		IHC	Kleiter et al. 2004		
<i>Carcinomes ovariens</i>	24	71	IHC	Impellizzeri et al. 2008		
	11	82	IHC	Borzacchiello et al. 2007		
	3	67	IHC	Khan et al. 2001		
<i>Adénocarcinomes colorectaux</i>	21	43	IHC	Knotenbelt et al. 2006		
<i>Tumeurs colorectales</i>	35	57	IHC, WB	McEntee et al. 2002		
<i>Tumeurs à cellules rondes</i>	49	86	IHC	Prada et al. 2012		
	<i>Martocytomes</i>	53	78	IHC	Vascellari et al. 2013	
		17	6	IHC	Heller et al. 2005b	
	<i>Sarcomes histiocytaires</i>	20	5	IHC	Heller et al. 2005b	
	<i>Lymphomes</i>	12	0	IHC	Rodrigues et al. 2011	
10		0	IHC	Mohammed et al. 2004		
<i>Tumeurs mésoenchymateuses</i>	<i>Mélanomes oraux et cutanés</i>	57	70	IHC	Martinez et al. 2011	
	<i>Tumeurs mélanocytaires</i>	40	60	IHC	Pires et al. 2010	
	<i>Mélanomes oraux</i>	15	60	IHC	Mohammed et al. 2004	
	<i>Tumeurs mélanocytaires de l'ovaire</i>	57	37	IHC	Paglia et al. 2009	
	<i>Ostéosarcomes</i>	27	93	IHC	Millanta et al. 2012	
		44	77	IHC, WB	Mullins et al. 2004	
		13	23	IHC	Mohammed et al. 2004	
	<i>Méningiomes</i>	24	88	IHC, WB	Rossmisl et al. 2009	
	<i>Fibrosarcomes des tissus mous</i>	23	43	IHC	Nowak et al. 2007	
	<i>Fibrosarcomes oraux</i>	5	0	IHC	Mohammed et al. 2004	
<i>Héangiosarcomes</i>	19	0	IHC	Heller et al. 2005b		
<i>Gliomes</i>	20	0	IHC	Jankovsky et al. 2013		

IHC : immunohistochimie ; WB : Western blot

ANNEXE 2 : DETECTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE LA COX-2 SUR DES COUPES TISSULAIRES DE PRELEVEMENTS FIXES AU FORMOL ET INCLUS EN PARAFFINE A L'AIDE DE L'ANTICORPS M3617

- 1- **Effectuer** des coupes de 3 µm et placer sur des lames Starfrost
- 2- **Sécher** à l'étuve à 37-40°C pendant une nuit
- 3- **Déparaffiner** dans du toluène puis de l'acétone **3 x 5 min puis 2 x 5 min**
- 4- **Réhydrater** à l'eau courante **1 x 5 min**
- 5- **Incuber** au bain-marie (94-96°C) dans une solution de citrate à 10 mM (pH 6) **30 min**
- 6- **Incuber** dans un bain « Peroxidase Blocking Solution » **5 min à T°A**
- 7- **Rincer** au PBS
- 8- **Incuber** dans du sérum normal de chèvre dilué au 1/10^{ème} dans du PBS **20 min à T°A**
- 9- **Incuber** avec l'anticorps de souris **anti-COX-2** dilué au 1/200^{ème} **50 min à T°A**
- 10- **Rincer** au PBS
- 11- **Incuber** avec l'anticorps de chèvre **anti-Ig de souris biotinylé** **25 min à T°A**
- 12- **Rincer** au PBS
- 13- **Incuber** avec un complexe **streptavidine-biotine-peroxydase** **25 min à T°A**
- 14- **Rincer** au PBS
- 15- **Incuber** avec le substrat chromogène (**DAB**) **10 min**
- 16- **Rincer** au PBS
- 17- **Contre colorer** dans l'**Hématoxyline de Harris** **15 sec**
- 18- **Rincer** à l'eau courante
- 19- **Déshydrater** et **monter** à l'aide d'un **baume synthétique**

REFERENCES :

- « Peroxidase Blocking Solution » : S2023, DAKO
- anticorps de souris **anti-COX-2** : M3617, clone CX-294, DAKO
- anticorps de chèvre **anti-Ig de souris biotinylé** : K0675, LSAB®2, DAKO
- complexe **streptavidine-biotine-peroxydase** : K0675, LSAB®2, DAKO

min : minutes ; sec : secondes ; T°A : température ambiante ; Ig : immunoglobuline

ANNEXE 3 : RESULTATS DE L'ANALYSE HISTOPATHOLOGIQUE

Cas (n°)	Référence	Organe	Prélèvement	Analyse histopathologique	Diagnostic histopathologique
1	07P646	masse périanale	Exérèse Tumeur (lésion primitive)	néoformation nodulaire, à croissance infiltrante, mal délimitée et composée d'une prolifération cellulaire de densité irrégulière ; cellules tumorales de type mésenchymateuses au sein d'un stroma myxoïde très abondant ; atypies cytonucléaires marquées et quelques figures de mitose	Sarcome à cellules fusiformes moyennement différencié, infiltrant et à stroma myxoïde compatible en 1 ^{ère} intention avec un liposarcome
1	09P443	masse périanale	Exérèse Tumeur (récidive n°1)	prolifération mésenchymateuse maligne, dermique, mal délimitée, non encapsulée et modérément cellulaire ; atypies cytonucléaires assez marquées et figures de mitose faibles ; absence d'embolies visibles	Sarcome à stroma myxoïde compatible en 1 ^{ère} intention avec un liposarcome
2	10P30	muqueuse nasale	Biopsie	prolifération tumorale épithéliale maligne, densément cellulaire et envahissant nettement la muqueuse nasale ; atypies cytonucléaires marquées et rares figures de mitose ; absence d'images d'embolisation	Carcinome nasal tubulaire à solide , moyennement différencié
1	10P270	masse périanale	Exérèse Tumeur (récidive n°2)	tissu néoformé de nature mésenchymateuse développé à la jonction recto-anale, bien délimité, non encapsulé mais de croissance infiltrante ; atypies cytonucléaires marquées et figures de mitose occasionnelles ; absence d'images d'embolisation	Récidive de sarcome à stroma myxoïde
3	10P300	masse sous lombaire	Exérèse Métastase nodale	prolifération carcinomateuse, multilobulée, densément cellulaire, infiltrant le tissu adipeux adjacent ; atypies cytonucléaires marquées sur certaines plages et figures de mitose fréquentes	Métastase nodale d'un adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal
4	10P391	volutés nasales	Biopsie	tissu néoformé de nature épithéliale envahissant le chignon nasal ; atypies cytonucléaires franches et figures de mitose occasionnelles ; absence d'images d'embolisation	Tumeur maligne peu différenciée, à cellules épithélioïdes, de localisation nasale compatible en 1 ^{ère} intention avec un carcinome nasal peu différencié
5	11P39	masse osseuse	Exérèse Tumeur	tissu néoformé de nature mésenchymateuse, densément cellulaire, de croissance infiltrante ; atypies cytonucléaires marquées à sévères et figures de mitose fréquentes ; absence d'images d'embolisation	Ostéosarcome chondroblastique (sarcome de haut grade à différenciation cartilagineuse et osseuse)
6	11P84	masse mammaire	Exérèse Tumeur	tissu néoformé de nature épithéliale et glandulaire, de croissance infiltrante ; atypies cytonucléaires marquées et figures de mitose fréquentes ; infiltration corticale et médullaire de plusieurs sections de nœud lymphatique	Carcinome mammaire infiltrant, tubulo-papillaire complexe, d'évolution anaplasique avec métastase nodale inguinale
7	11P87	volutés nasales	Biopsie	tissu néoformé de nature épithéliale et glandulaire ; atypies cytonucléaires marquées et figures de mitose occasionnelles ; absence d'images d'embolisation	Adénocarcinome nasal bien différencié
8	11P108	masse osseuse	Exérèse Tumeur	tissu néoformé de nature mésenchymateuse, densément cellulaire ; atypies cytonucléaires marquées et figures de mitose régulièrement observées ; absence d'images d'embolisation	Ostéosarcome ostéoblastique productif
9	11P164	masse mammaire	Exérèse Tumeur	tissu néoformé de nature épithéliale, développé de manière multicentrique, bien délimité, de croissance infiltrante ; atypies cytonucléaires marquées et figures de mitose fréquentes ; absence d'images d'embolisation	Carcinome mammaire basaloïde infiltrant (ductulaire)

Cas (n°)	Référence	Organe	Prélèvement	Analyse histopathologique	Diagnostic histopathologique
10	11P173	masse osseuse	Exérèse Tumeur	tissu néoformé de nature mésoenchymateuse, densément cellulaire, de croissance infiltrante ; atypies cytonucléaires franches et figures de mitose difficiles à évaluer	Sarcome à cellules fusiformes, infiltrant, effondrant l'os et les tissus environnants compatible en 1 ^{ère} intention avec un ostéosarcome
11	11P221	masse mammaire	Exérèse Métastase nodale	tissu néoformé de nature épithéliale et glandulaire, densément cellulaire, de croissance infiltrante ; atypies cytonucléaires marquées et figures de mitose fréquentes ; infiltration des nœuds lymphatiques inguinaux	Métastase nodale d'un adénocarcinome mammaire tubulo-trabéculaire peu différencié
12	11P243	parathyroïde	Exérèse Tumeur	tissu néoformé nodulaire, de nature épithéliale, bien délimitée, partiellement encapsulée, de croissance localement infiltrante ; atypies cytonucléaires franches et figures de mitose régulièrement observées ; absence d'images d'embolisation	Carcinome parathyroïdien
13	11P343	rate	Exérèse Tumeur	tissu néoformé de nature mésoenchymateuse maligne, de densité cellulaire variable ; atypies cytonucléaires marquées et figures de mitose rares	Hémangiosarcome splénique
14	11P353	masse mammaire	Exérèse Tumeur	prolifération carcinomateuse, très infiltrante, non encapsulée densément cellulaire ; atypies cytonucléaires assez marquées et figures de mitose fréquentes ; envahissement tumoral du nœud lymphatique inguinal	Comédocarcinome mammaire développé au sein de lésions de dysplasie mammaire avec métastase nodale
15	11P386	masse hépatique	Exérèse Tumeur	tissu néoformé de nature mésoenchymateuse maligne, densément cellulaire ; atypies cytonucléaires marquées et figures de mitose fréquentes	Hémangiosarcome hépatique
16	11P390	masse rétro-mandibulaire	Exérèse Tumeur	tissu néoformé de nature épithéliale, densément cellulaire, infiltrante, encapsulée ; atypies cytonucléaires sévères et figures de mitose rares ; rares images d'embolisation vasculaire	Carcinome thyroïdien compact avec images d'effraction vasculaire
17	11P402	nodules cutanés	Exérèse Tumeur	prolifération épidermique infiltrant plus ou moins largement le derme ; atypies cytonucléaires marquées et figures de mitose fréquentes sur certaines plaques ; absence d'embolies visibles	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique, infiltrant et moyennement différencié
18	12/1063	appareil urinaire, cœlon, NL lombo-aortique	Autopsie	envahissement du trigone vésical et de l'uretère proximal avec extension loco-régionale en face séreuse du cœlon et métastases nodales lombo-aortiques ; embolies lymphatiques multiples	Carcinome transitionnel vésical
19	12P21	surrénale	Exérèse Tumeur	prolifération tumorale épithéliale, d'origine corticale, infiltrant multifocalement la capsule et semblant avoir envahi également la médulla ; nette différenciation corticosurrénalienne des cellules tumorales dans la plupart des cas	Carcinome corticosurrénalien

NL : nœud lymphatique

ANNEXE 4 : RESULTATS DE LA DETECTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE LA COX-2

Cas (n°)	Référence	Prélèvement	Décalcification	Type tumoral	Qualité du marquage	Répartition du marquage	Proportion de cellules marquées	Intensité du marquage	Score IHC
1	07P646	Exérèse Tumeur (lésion primitive)	non	Liposarcome	bonne	zones d'ulcération	0	0	0
1	09P443	Exérèse Tumeur (récidive n°1)	non	Liposarcome	bonne	épiderme réactionnel et zones d'ulcération	0	0	0
2	10P30	Biopsie	non	Carcinome nasal moyennement différencié	bonne	épithélium de surface	0	0	0
1	10P270	Exérèse Tumeur (récidive n°2)	non	Liposarcome					
3	10P300	Exérèse Métastase	non	Métastase nodale d'un adénocarcinome des glandes apocrines du sac anal	bonne	multifocale	1	1	1
4	10P391	Biopsie	non	Carcinome nasal peu différencié					
5	11P39	Exérèse Tumeur	oui	Ostéosarcome chondroblastique					
6	11P84	Exérèse Tumeur	non	Carcinome mammaire d'évolution anaplasique avec métastase nodale	bonne	multifocale	1	3	3
7	11P87	Biopsie	non	Adénocarcinome nasal bien différencié	bonne	multifocale	1	3	3
8	11P108	Exérèse Tumeur	oui	Ostéosarcome ostéoblastique productif					
9	11P164	Exérèse Tumeur	non	Carcinome mammaire basaloïde infiltrant	bonne	focale	2	3	6
10	11P173	Exérèse Tumeur	oui	Ostéosarcome					
11	11P221	Exérèse Métastase	non	Métastase nodale d'un adénocarcinome mammaire peu différencié	bonne	en périphérie des zones de nécrose	1	2	2
12	11P243	Exérèse Tumeur	non	Carcinome parathyroïdien					
13	11P343	Exérèse Tumeur	non	Hémangiosarcome splénique					
14	11P353	Exérèse Tumeur	non	Comédocarcinome mammaire avec métastase nodale	bonne	cellules inflammatoires et épithélium	0	0	0
15	11P386	Exérèse Tumeur	non	Hémangiosarcome hépatique	bonne	multifocale	1	2	2
16	11P390	Exérèse Tumeur	non	Carcinome thyroïdien					
17	11P402	Exérèse Tumeur	non	Carcinome épidermoïde cutané d'évolution multicentrique	bonne	diffuse	2	3	6
18	12/1063	Autopsie	non	Carcinome transitionnel vésical	bonne	en périphérie des zones de nécrose	2	3	6
19	12P21	Exérèse Tumeur	non	Carcinome corticosurrénalien	bonne	diffuse	1	2	2

absence de réactivité anti-COX-2

absence de réactivité tumorale anti-COX-2

IHC : immunohistochimique

TOULOUSE, 2013

NOM : Kuca

PRENOM : Thibaud

TITRE : Etude préliminaire de l'usage des inhibiteurs de la COX-2 dans le traitement des tumeurs canines

RESUME : La COX-2 constitue une cible pharmacologique prometteuse dans le traitement des tumeurs canines. Le premier objectif de cette étude préliminaire était de mettre au point une technique standardisée de détection immunohistochimique afin d'évaluer rétrospectivement l'expression de la COX-2 dans des tumeurs canines malignes d'origine épithéliale et mésenchymateuse. Le second objectif était d'évaluer la tolérance et l'efficacité clinique des inhibiteurs de la COX-2 dans le traitement de ces tumeurs. Nous avons tenté d'évaluer les relations éventuelles entre l'expression de la COX-2, le potentiel métastatique, la survenue de récurrence locale et l'efficacité clinique des inhibiteurs de la COX-2. Une immunoréactivité tumorale anti-COX-2 a été mise en évidence dans 9 prélèvements sur 21 (43%). La tolérance des inhibiteurs de la COX-2 a été très bonne dans la majorité des cas. Ces résultats préliminaires ont permis de cibler les types tumoraux qui feront l'objet d'études prospectives sur l'intérêt de l'expression de la COX-2 dans l'évaluation pronostique et le traitement des tumeurs canines.

MOTS-CLES : chien, cyclo-oxygénase-2, inhibiteur de la COX-2, tumeur, immunohistochimie, oncologie, AINS, tolérance

TITLE : Preliminary study on the use of COX-2 inhibitors for treatment of canine tumors

ABSTRACT : COX-2 seems to be a promising pathway to target in order to achieve antitumoral effects in dogs. The first purpose of this preliminary study was to develop a standard immunodetection technique to retrospectively evaluate the expression of COX-2 in malignant canine tumors of epithelial and mesenchymal origins. The second purpose was to evaluate the safety and the clinical efficacy of COX-2 inhibitors for treatment of such cancers. We tried to evaluate the correlations between COX-2 expression, metastatic potential, local recurrence and clinical efficacy of COX-2 inhibitors. Immunostaining revealed that 9/21 (43%) of the tumor samples were positive for COX-2. COX-2 inhibitors were generally very well tolerated by dogs. Results of this preliminary study allow us to identify types of canine cancer that could be used for prospective studies of the significance of COX-2 expression in prognosis and treatment of canine tumors.

KEYWORDS: dog, cyclooxygenase-2, COX-2 inhibitor, tumor, immunohistochemistry, oncology, NSAID, safety