HAL
open science

Effets d'inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 sur la prolifération et la survie de cellules cancéreuses hématopoïétiques

Cyril Sobolewski

To cite this version:

Cyril Sobolewski. Effets d'inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 sur la prolifération et la survie de cellules cancéreuses hématopoïétiques. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2011. Français. NNT : 2011NAN10102 . tel-01746243

HAL Id: tel-01746243

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746243v1

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale Biologie - Santé – Environnement

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

Mention Sciences de la Vie et de la Santé

Par **Sobolewski Cyril**

Effets d'inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 sur la prolifération et la survie de cellules cancéreuses hématopoïétiques

Soutenance publique le 10 novembre 2011

Président du jury :

Mme Denyse BAGREL	Professeur, Université de Metz, France

Rapporteurs :

M. Dan A.DIXON	Professeur, Université de la Caroline du sud, Etats-Unis
Mme Lina GHIBELLI	Professeur, Université Tor Vergata, Rome, Italie

Examinateurs :

M. Philippe BECUWE	Professeur, Université de Nancy I, France
M. Mario DICATO	Professeur, Centre Hospitalier de Luxembourg
M. Marc DIEDERICH	Docteur, Hôpital Kirchberg, Luxembourg
M. Lionel DOMENJOUD	Docteur, Université de Nancy I, France
M. Jean Louis MERLIN	Professeur, Université de Nancy I, France

Membres invités :

Mme Claudia CERELLA	Docteur, Hôpital Kirchberg, Luxembourg
M. Jean-Claude MARTINOU	Professeur, Université de Genève, Suisse
M. Athanase VISVIKIS	Professeur, Université de Nancy I, France

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC)

Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg, L-2540 Luxembourg.

Les travaux présentés dans ce mémoire on été réalisés

au « Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer »

de la Fondation de « Recherche Cancer et Sang »

à l'Hôpital Kirchberg, Luxembourg

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier :

du « Télévie Luxembourg » (bourse de formation-recherche Télévie)

de la Fondation « Recherche Cancer et Sang (FRCS) »

de l'association « Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL)

de l'association « Action Lions « Vaincre le Cancer » »

et de l'association « Een Häerz fir Kriibskrank Kanner

(Un cœur pour les enfants atteints d'un cancer) »

Remerciements

Je tiens à remercier les personnes qui ont participé à l'aboutissement de ce travail, ainsi que les gens qui m'ont apporté leur soutien durant ces trois années de doctorat.

Tout d'abord, je remercie le Docteur Marc Diederich de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire mais aussi de m'avoir guidé pendant le déroulement de mon projet.

Je voudrais aussi remercier le Professeur Mario Dicato, le président de la Fondation Recherche Cancer et Sang de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de sa fondation.

Je remercie également le Professeur Lionel Domenjoud d'avoir accepté d'être mon co-directeur de thèse et d'avoir suivi avec attention l'avancement de mes travaux.

Je remercie le Docteur Claudia Cerella d'avoir été mon encadrante pendant ces trois dernières années, de m'avoir enseigné le métier de chercheur et d'avoir été à mon écoute pendant les moments difficiles.

Je remercie les Professeurs Dan A.Dixon et Lina Ghibelli d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie aussi les Professeurs Philippe Becuwe, Denyse Bagrel, Jean-Louis Merlin, Jean-Claude Martinou et Athanase Visvikis d'avoir accepté de figurer dans mon jury de thèse.

Je remercie aussi l'ensemble des membres du laboratoire et particulièrement, Marie-Hélène pour son apport régulier et nécessaire en Kinder Schoko-bons, Sébastien pour les nombreuses bières partagées, Elodie, Franck, Michael, Marc, Anthoula, Cindy, Fabienne ainsi que les autres membres du laboratoire, pour leur soutien et leurs conseils avisés.

J'adresse aussi mes remerciements au Docteur Stéphania Gonfloni pour ses nombreux conseils et son soutien ainsi qu'aux anciens membres du laboratoire avec qui j'ai partagé de très bon moments, notamment, Jenny, Tom, Isabelle, Simone, Sylvia.

Enfin, je remercie de tout cœur ma mère Jocelyne, pour avoir toujours cru en moi, mais aussi mon père Jean-Claude ainsi que ma sœur, Laura. Toutes ces années d'études n'auraient pas pu aboutir sans votre soutien. Cette thèse est aussi la vôtre.

Je remercie aussi l'ensemble de mes amis et particulièrement Aurore, Bélam, Christophe, Mélanie, Raphaelle et Sabrina qui m'ont apporté leur soutien et avec qui j'ai passé des moments inoubliables ces dernières années.

Je remercie aussi de tout coeur ma copine Noémie. Nos chemins se sont croisés durant ce périple. Je dois l'aboutissement de ce travail à son soutien, sa patience et son dévouement.

Merci !

Publications liées à cette thèse :

Travaux originaux

a) COX-2 inhibitors induce early c-MYC downregulation and cell differentiation marker expression in hematopoietic cancer cell models.

Cyril Sobolewski, Claudia Cerella, Mario Dicato and Marc Diederich. Cell Cycle, 2011 Sep 1 ;10 (17).

b) COX-2 inhibitors block chemotherapeutic agent-induced apoptosis prior to commitment in hematopoietic cancer cells.

Claudia Cerella, **Cyril Sobolewski**, Sébastien Chateauvieux, Estelle Henry, Michael Schnekenburger, Jenny Ghelfi, Mario Dicato and Marc Diederich. Biochemical Pharmacology, 2011 Jun 24.

Revues

a) The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies.

Cyril Sobolewski, Claudia Cerella, Lina Ghibelli, Mario Dicato and Marc Diederich. International Journal of Cell Biology, 2010; 2010:215158.

b) Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to the synthetic COX-2 inhibitors in chemoprevention and in therapy

Claudia Cerella, **Cyril Sobolewski**, Mario Dicato and Marc Diederich. Biochemical Pharmacology, 2010 Dec 15; 80(12):1801-15.

Autres publications :

Editoriaux

a) Inflammation: novel arrows for an ancient target.

Cyril Sobolewski, Noémie Legrand, Franck Morceau and Marc Diederich. Biochemical Pharmacology, 2010 Dec 15; 80(12):1769-70.

b) Integrated cellular pathology-Systems biology of human diseases.

Cyril Sobolewski, Elodie Viry, Noémie Legrand, Florian Muller, Franck Morceau and Marc Diederich. Biochemical Pharmacology, 2011 Jun 16.

Activités scientifiques

Présentations orales :

a) Cyclooxygenase-2 inhibition sensitizes human colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through clustering of DR5 and concentrating death-inducing signaling complex components into ceramide-enriched caveolae

Journal club à l'hôpital Kirchberg, Luxembourg

(22.04.2008)

b) Phosphorylation of p27 Kip1 regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4.

Journal club à l'hôpital Kirchberg, Luxembourg

(09.06.2009)

c) c-Myc suppression of miR-23 enhances mitochondrial glutaminase and glutamine.metabolism.

Journal club à l'hôpital Kirchberg, Luxembourg

(02.11.2010)

c) Effects of cyclooxygenase-2 inhibitors on cell proliferation and apoptosis in human hematologic malignancies.

Life Sciences PhD days, Université de Luxembourg, Luxembourg

(13.09.2011)

Communications par affiche

a) Effects of COX-2 inhibition on cell proliferation and survival to etoposide treatment on human hematopoietic cancer cell lines.

Cyril Sobolewski, Claudia Cerella, Sébastien Chateauvieux, Mario Dicato and Marc Diederich

XVI ECDO (European Cell Death Organization) meeting

Bern, 2008

b) Effect of COX-2 inhibitors on cell proliferation of human hematopoietic cancer cell lines.
Cyril Sobolewski, Claudia Cerella, Sébastien Chateauvieux, Mario Dicato and Marc Diederich
XVI ECDO (European Cell Death Organization) meeting
Paris, Septembre 2009

c) COX-2 inhibitors prevent apoptosis induced by chemotherapeutic drugs via overexpression of multidrug chemoresistance proteins in a COX-2-positive human hematopoietic cancer cell line.
Claudia Cerella, **Cyril Sobolewski**, Sebastien Chateauvieux, Michael Schnekenburger, Mario Dicato and Marc Diederich
XVII ECDO (European Cell Death Organization) meeting
Paris, Septembre 2009

d) COX-2 inhibitors prevent apoptosis induced by chemotherapeutic drugs via overexpression of multidrug chemoresistance proteins in a COX-2-positive human hematopoietic cancer cell line (nouvelle version).
Claudia Cerella, **Cyril Sobolewski**, Sebastien Chateauvieux, Michael Schnekenburger, Mario Dicato and Marc Diederich
Télévie, Séminaire des jeunes chercheurs
Liège- Gembloux, Décembre 2009

e) Anti-apoptotic effects of COX-2 inhibitors.
Claudia Cerella, **Cyril Sobolewski**, Sebastien Chateauvieux, Michael Schnekenburger, Mario Dicato and Marc Diederich
Inflammation 2010
Luxembourg, Janvier 2010

f) Effect of COX-2 inhibitors on cell proliferation of human hematopoietic cancer cell lines.
Cyril Sobolewski, Claudia Cerella, Sébastien Chateauvieux, Mario Dicato and Marc Diederich
Inflammation 2010
Luxembourg, Janvier 2010

g) Determinants of the inhibitory effects of COX-2 inhibitors on cell proliferation in hematopoietic malignancies (nouvelle version).
Cyril Sobolewski, Claudia Cerella, Cindy Grandjenette, Mario Dicato and Marc Diederich
XVIII ECDO (European Cell Death Organization) meeting
Ghent, Septembre 2010

h) Determinants of the inhibitory effects of COX-2 inhibitors on cell proliferation in hematopoietic malignancies (nouvelle version).
Cyril Sobolewski, Claudia Cerella, Cindy Grandjenette, Mario Dicato and Marc Diederich
Télévie, Séminaire des jeunes chercheurs
Bruxelles, Décembre 2010

i) Celecoxib counteracts curcumin-induced apoptosis via cell cycle perturbation in hematologic malignancies.
Cyril Sobolewski, Florian Muller, Claudia Cerella, Mario Dicato and Marc Diederich
XIX ECDO (European Cell Death Organization) meeting
Stockholm, Septembre 2011

Autres activités

a) Participation au congrès Oncotrans « Du laboratoire au patient et du patient au laboratoire ».
Nancy, Septembre 2009.

b) Participation au congrès Signal-Omics : membre du comité d'organisation
Luxembourg, Janvier 2011

c) Participation active à la « researchers's night » (organisé par le Fond National de la Recherche)
Luxembourg, 2008
Luxembourg, 2010

Préambule : présentation du laboratoire d'accueil du candidat

Le Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) est un laboratoire de recherche privé contre le cancer à but non lucratif, composé d'environ vingt chercheurs. Basé à Luxembourg, sa position géographique avantageuse, au centre de l'Europe, lui permet de collaborer avec d'autres laboratoires européens tels que ceux de Metz, Nancy, Reims, Liège, Bruxelles, Sarrebruck, mais aussi outre-Atlantique avec les universités de Houston et de Cincinnati.

L'une des thématiques du laboratoire est la compréhension du lien entre l'inflammation et le cancer, notamment dans les leucémies, impliqué dans les mécanismes de résistance contre les agents chimiothérapiques. Le but est de découvrir de nouvelles approches de traitements afin de contourner ces mécanismes, notamment grâce aux composés naturels (i.e. la curcumine).

La seconde thématique vise à comprendre les mécanismes de différenciation, partant du concept que les cellules cancéreuses sont moins différenciées que les cellules normales avec un taux de prolifération élevé, le but est donc de rendre ces cellules plus matures, pour conduire à une prolifération moins importante.

Le dernier groupe de recherche a pour objectif de comprendre les mécanismes épigénétiques mis en cause dans le développement des cancers, afin de trouver de nouveaux biomarqueurs permettant de prédire au plus tôt le développement de cancers, et améliorer leur prévention.

Le laboratoire est financé par plusieurs associations telles que le Télévie, l'asbl Recherches Scientifiques Luxembourg, la Fondation de Recherche Cancer et Sang, l'association « Een Haerz fir kriibskrank Kanner » ainsi que le ministère de la recherche luxembourgeoise.

Résumé

Les cyclooxygénases (COXs) sont une famille d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des prostaglandines. COX-2 est la forme inductible qui est induite pendant l'inflammation et qui est surexprimée dans plusieurs cancers. Plusieurs évidences suggèrent que COX-2 joue un rôle dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. Ces évidences concernent surtout les tumeurs solides et les mécanismes impliqués ne sont pas complètement connus et surtout pour les cancers d'origine hématopoïétique. Pour notre étude, nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs de COX-2 (nimésulide, NS-398 et célécoxib) sur la prolifération et l'apoptose de lignées cellulaires leucémiques et lymphoblastiques, Hel, Jurkat, Raji et U937.

Nous avons montré que les différents inhibiteurs de COX-2 diminuent la prolifération des différentes lignées cellulaires. Les cellules U937 sont apparues comme les cellules les plus sensibles à ces inhibiteurs alors que les cellules K562 étaient les plus résistantes. Nous avons montré que cette modulation correspond à une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, accompagnée d'une diminution précoce de l'expression de c-Myc et d'une augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation dans les cellules U937 (CD15) et Hel (CD41a et CD61).

Dans la deuxième partie de ce projet, nous avons étudié les effets des différents inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose induite par différents agents chimiothérapeutiques dans nos modèles cellulaires. Nous avons ainsi montré que les inhibiteurs de COX-2 inhibent fortement l'apoptose induite par plusieurs agents chimiothérapeutiques. Nous avons démontré que la prévention de l'apoptose se situe avant l'activation de Bax et de Bak. Par ailleurs, cet effet est caractérisé par une incapacité des agents chimiothérapeutiques à déclencher un stress apoptotique. Toutes nos données ont donc démontré un effet anti-apoptotique des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose intrinsèque *vs* l'apoptose extrinsèque à un stade précoce de l'induction de l'apoptose. Ces données suggèrent des précautions quant à l'utilisation des inhibiteurs de COX-2 en combinaison avec la chimiothérapie.

Dans la troisième partie de notre projet, nous avons étudié la combinaison des inhibiteurs de COX-2 avec la curcumine, une substance naturelle connue pour ses propriétés antitumorales. Nos travaux ont montré que la curcumine seule conduit à une accumulation des cellules U937 en phase G2/M du cycle cellulaire, suivie d'une induction d'apoptose. Cependant, le prétraitement des cellules U937 avec du célécoxib à des concentrations non-apoptogéniques contrecarre l'apoptose induite par la curcumine, suggérant ainsi que ce type de combinaison ne serait pas une bonne stratégie dans les cellules hématopoïétiques.

L'utilisation chronique des inhibiteurs de COX-2 peut être associée à des effets secondaires importants consécutifs à l'inhibition de l'activité de COX-2. Dans la dernière partie de notre projet, nous avons démontré que le 2,5 diméthyl-célécoxib (DMC), un analogue du célécoxib qui n'inhibe pas l'activité de COX-2, induit une diminution de la prolifération cellulaire et induit l'apoptose des cellules U937 et K562. Par ailleurs, ces effets sont plus importants que ceux observés avec le célécoxib. Par conséquent, ce composé a démontré de meilleures propriétés antitumorales et représente une voie thérapeutique prometteuse contre les leucémies.

Tous nos résultats soutiennent donc l'idée que les inhibiteurs de COX-2 présentent les effets anti-tumoraux les plus efficaces que lorsqu'ils sont administrés seuls. Les effets observés avec le DMC suggèrent que ce composé pourrait représenté une voie alternative aux inhibiteurs de COX-2 en thérapie anti-cancéreuse.

Mots-clefs : COX-2, leucémie, inflammation, apoptose, cycle cellulaire, c-Myc.

Abstract

Cyclooxygenases (COXs) are a family of enzymes, which catalyze the rate-limiting step in prostaglandin biosynthesis. COX-2 is the inducible isoform, upregulated during inflammation and overexpressed in various cancers. There are evidences of a role for COX-2 in cell proliferation and apoptosis especially in solid tumors, whereas little is known for cancers of hematopoietic origin. In our study, we analyzed the effect of COX-2 inhibitors (nimesulide, NS-398 and celecoxib) on cell proliferation and apoptosis of a panel of leukemic and lymphoblastic cell lines, Hel, Jurkat, K562, K562, Raji and U937.

We found that the different inhibitors slow down cell proliferation in the different hematologic cell lines tested. U937 cells appeared as the most sensitive, whereas K562 were the most resistant to this effect. We provide evidence that this modulation corresponds to an accumulation of the cells in G0/G1 paralleled by an early downregulation of c-Myc and the expression of cell type-specific differentiation markers in U937 (CD15) and Hel (CD41a and CD61).

In the second part of our study, we investigate the effect of COX-2 inhibitors on apoptosis induced by chemotherapeutic agents in our cell models. We demonstrated that COX-2 inhibitors strongly prevent apoptosis induced by a panel of chemotherapeutic agents. We demonstrated an early prevention of apoptotic signaling, prior to Bax/Bak activation. The preventive effect is associated with an impairment of the ability of chemotherapeutic agents to trigger their apoptogenic stress. Altogether, our results demonstrate an anti-apoptotic effect of COX-2 inhibitors on intrinsic *vs.* extrinsic apoptosis at early steps of apoptosis commitment. These results suggest cautions in the use of COX-2 inhibitors with chemotherapy.

In the third part of our project, we investigated the combination of COX-2 inhibitors with curcumin, a natural product known for its anti-tumor properties. Our findings show that curcumin alone leads to an accumulation of U937 cells in G2/M phase of cell cycle, followed by an induction of apoptosis. However, the pretreatment of U937 cells with celecoxib at non-apoptogenic concentrations, counteracted curcumin-induced apoptosis, thus showing that this combination is not a good anti-cancer strategy in our cell models.

The chronic use of COX-2 inhibitors can be associated with severe side effects due to the inhibition of COX-2 enzyme. In the last part of our project, we demonstrated that 2,5 dimethyl-celecoxib (DMC), a structurally analogue of celecoxib, which is not able to inhibit COX-2 activity, induces an inhibition of cell proliferation and an induction of apoptosis in U937 and K562 cells. These effects are stronger than those observed with celecoxib. Thus, this compound demonstrated better anti-tumor properties and may represent a promising therapeutic approach against leukemia.

Altogether, our study supports the idea that COX-2 inhibitors display anti-tumor effects in our cell models, but only when administrated alone. The effects observed with DMC suggest that this compound may represent an alternative approach to COX-2 inhibitors in cancer therapy.

Key words: COX-2, leukemia, inflammation, apoptosis, cell cycle, and c-Myc.

Sommaire

1 INTRODUCTION 1
1.1 Inflammation et cancer 1
1.1.1 Les cancers 1
1.1.2 Lien entre l'inflammation et le cancer 6
1.1.3 Les cyclooxygénases 9
1.1.3.1 COX-1 16
1.1.3.2 COX-2 17
1.1.3.3 COX-3 23
1.1.4 COX-2 et cancer 23
1.1.5 Les inhibiteurs synthétiques et naturels de COX-2 26
1.1.5.1 Les inhibiteurs synthétiques de COX-2 26
1.1.5.2 Les inhibiteurs naturels de COX-2 30
1.2 Implications de COX-2 dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire 33
1.2.1 Régulation et surveillance du cycle cellulaire 33
1.2.1.1 Le cycle cellulaire 33
1.2.1.2 Régulation des différentes étapes du cycle cellulaire 35
1.2.2 La progression du cycle cellulaire 35
1.2.2.1 Les protéines de la famille Myc et la régulation de la transition G1/S 35
1.2.2.2 La transition G2/M du cycle cellulaire 37
1.2.3 Surveillance du cycle cellulaire 38
1.2.4 Prolifération cellulaire et cancer 39
1.2.4.1 Altérations de la machinerie constitutive du cycle cellulaire 41
1.2.4.2 Altérations des protéines impliquées dans la surveillance du cycle cellulaire 41
1.2.5 COX-2 et prolifération cellulaire 42
1.3 Implication de COX-2 dans l'apoptose 45
1.3.1 L'apoptose 45
1.3.1.1 Les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque 47
1.3.1.2 Apoptose et cancer 52
1.3.2 COX-2 et l'apoptose intrinsèque 53
1.3.3 COX-2 et l'apoptose extrinsèque 55
1.4 COX-2 et la chimiothérapie 56
1.4.1 Les agents chimiothérapeutiques 58
1.4.2 Chimiothérapie et chimiorésistance 60
1.4.3 Les inhibiteurs de COX-2 en combinaison avec la chimiothérapie 62

2 Objectifs 64
2.1 Hypothèse générale de travail 64
2.2 Objectifs spécifiques 64

3 Matériels et méthodes 66
3.1 Lignées cellulaires et traitements 66
3.1.1 Lignées cellulaires 66
3.1.2 Traitements 67
3.2 Étude de la prolifération cellulaire 67
3.2.1 Coloration d'exclusion au bleu de trypan 67
3.2.2 Marquage au Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE) 67
3.2.3 Mesure de l'index mitotique par coloration de May Grünwald GIEMSA 70
3.3 Etude du cycle cellulaire 71
3.3.1 Marquage à l'iodure de propidium 71
3.3.2 Marquage pour l'antigène nucléaire Ki-67 71
3.4 Extractions de protéines totales 71
3.5 Analyse de l'expression des protéines par Western Blot 72

3.6 Analyse de l'expression de gènes au niveau de l'ARNm par RT-PCR 73
3.6.1 Extraction et purification des ARNm 73
3.6.2 Transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) 76
3.6.2.1 Transcription inverse 76
3.6.2.2 Protocole de transcription inverse pour les microARNs 77
3.6.2.3 Amplification par PCR quantitative 77
3.7 Etude de l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur la production de prostaglandine E2 par ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay). 81
3.8 Etude de la différenciation cellulaire 81
3.8.1 Etude de l'expression de marqueurs de différenciation myéloïde 81
3.8.2 Etude de la différenciation érythroïde par le test à la benzidine 82
3.9 Etude de la senescence par observation de l'activité β-galactosidase intracellulaire 82
3.10 Etude de la masse lysosomiale 83
3.11 Évaluation de l'apoptose 83
3.11.1 Etude de la morphologie nucléaire 83
3.11.2 Étude du potentiel membranaire mitochondrial 84
3.11.3 Étude de la libération du cytochrome c par la mitochondrie 84
3.11.4 Étude de l'activation et de la translocation mitochondriale de Bax et de Bak 85
3.11.5 Test d'efflux de la rhodamine 123 86
3.11.6 Evaluation des altérations de l'ADN 87
3.12 Analyse statistique 87

4 Résultats 88
4.1 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération des lignées cellulaires hématopoïétiques. 88
4.2 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose des différentes lignées cellulaires. 92
4.3 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur le cycle cellulaire 96
4.3.1 Effet du nimésulide sur le cycle cellulaire 96
4.3.2 Effet du NS-398 sur le cycle cellulaire 97
4.3.3 Effet du célécoxib sur le cycle cellulaire 97
4.3.4 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression d'acteurs de la transition G1/S du cycle cellulaire 102
4.3.5 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de la protéine c-Myc 109
4.3.6 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression et la stabilité de l'ARNm de c-Myc 116
4.3.7 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur la phosphorylation de ERK1/2 et de p38 MAPK 121
4.3.8 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de microARNs 121
4.3.9 Etude de l'expression de COX-2 et de la synthèse de PGE2 après traitement par les inhibiteurs de COX-2 122
4.3.10 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de marqueurs de différentiation myéloïde 131
4.4 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose intrinsèque de lignées cellulaires hématologiques 141
4.4.1 Effet du nimésulide et du NS-398 sur l'apoptose induite par l'étoposide 141
4.4.2 Effet du nimésulide et du NS-398 sur l'apoptose induite par d'autres agents inducteurs de l'apoptose intrinsèque 143
4.4.3 Effet du nimésulide et du NS-398 sur l'apoptose extrinsèque 145
4.4.4 Étude de la dépendance avec l'activité de COX-2 148
4.4.5 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose induite par le cisplatine dans les autres lignées cellulaires 150
4.4.6 Effet du nimésulide et du NS-398 sur la voie intrinsèque mitochondriale 153
4.4.7 Effet du nimésulide sur l'activation de Bax et de Bak durant l'apoptose 158

4.4.8 Effet du nimésulide sur l'activation de JNK 1 et 2/3 et p38MAPK, induite par l'étoposide 164
4.4.9 Effet du nimésulide sur la protéolyse de Bcl-2 induite par l'étoposide 165
4.4.10 Les inhibiteurs de COX-2 préviennent les altérations de l'ADN induites par l'étoposide 168
4.4.11 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur des protéines de transport des agents chimiothérapeutiques 171
4.4.12 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'autophagie 177
4.5 Effet de la curcumine et de la combinaison célécoxib/curcumine sur la prolifération et la survie de lignées cellulaires hématologiques. 180
4.5.1 Effet de la curcumine sur l'apoptose des lignées cellulaires hématologiques. 180
4.5.2 Effet de la combinaison curcumine/célécoxib sur les cellules U937 et K562 185
4.6 Effet du 2,5-diméthyl-célécoxib, un analogue du célécoxib, sur la prolifération et la survie de lignées cellulaires hématologiques. 191

5 Discussion 196
5.1 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération et le cycle cellulaire de lignées tumorales hématologiques 196
5.1.1 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération cellulaire 196
5.1.2 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur le cycle cellulaire 197
5.1.3 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de c-Myc 199
5.1.4 Evaluation de l'implication de COX-2 dans les différentes lignées cellulaires 201
5.1.5 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de marqueurs de différenciation myéloïdes 203
5.2 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose des lignées cellulaires hématologiques 207
5.2.1 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose intrinsèque 207
5.2.2 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose extrinsèque des lignées cellulaires 208
5.2.3 Les inhibiteurs de COX-2 préviennent l'apoptose intrinsèque avant l'initiation de l'apoptose. 209
5.2.4 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur des protéines de transport des agents chimiothérapeutiques 210
5.3 Etude des liens entre les différents effets induits par les inhibiteurs de COX-2 . 214
5.4 Effet de la curcumine et de la combinaison curcumine /célécoxib sur la prolifération et l'apoptose des cellules U937 et K562 215
5.5 Effet du 2,5-Diméthyl-célécoxib sur la prolifération et l'apoptose des cellules U937 et K562 217

6 Conclusion 219

7 Perspectives 221
7.1 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération et le cycle cellulaire de lignées tumorales hématologiques 221
7.2 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose des lignées cellulaires hématologiques 223
7.3 Effet de la curcumine et de la combinaison curcumine /célécoxib sur la prolifération et l'apoptose des cellules U937 et K562 224

Table des illustrations

Figures :

FIGURE 1 : INCIDENCE ET MORTALITE DES CANCERS EN UNION EUROPEENNE EN 2008 2
FIGURE 2 : L'HEMATOPOÏESE ET LES LEUCEMIES 3
FIGURE 3: LES DIFFERENTES ETAPES DE LA CANCEROGENESE. 10
FIGURE 4 : MECANISMES SIMPLIFIES DE L'INFLAMMATION 11
FIGURE 5 : METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE PAR LES CYCLOOXYGENASES 12
FIGURE 6 : METABOLISME DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE PAR LES CYCLOOXYGENASES 13
FIGURE 7 : LES DIFFERENTS RECEPTEURS DES PROSTAGLANDINES 14
FIGURE 8 : VOIES DE SIGNALISATION REGULANT L'EXPRESSION DE COX-2 21
FIGURE 9 : MODE D'ACTION DES AINS 28
FIGURE 10 : LES PRODUITS NATURELS QUI DIMINENT L'EXPRESSION DE COX-2 AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL 32
FIGURE 11 : LE CYCLE CELLULAIRE ET LES PRINCIPALES CYCLINES/CDKS IMPLIQUEES 34
FIGURE 12 : LA TRANSITION G1/S DU CYCLE CELLULAIRE 40
FIGURE 13 : EFFETS D'INHIBITEURS DE COX-2 SUR LE CYCLE CELLULAIRE 44
FIGURE 14 : L'EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DURANT L'APOPTOSE 46
FIGURE 15 : LES VOIES EXTRINSEQUE ET INTRINSEQUE DE L'APOPTOSE (D'APRES COPPOLA, GHIBELLI., 2000 AVEC MODIFICATIONS) 48
FIGURE 16: STRUCTURES DE QUELQUES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2 50
FIGURE 17 : ACTIONS INHIBITRICES DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR L'APOPTOSE INTRINSEQUE ET EXTRINSEQUE. 57
FIGURE 18 : EVALUATION DE L'EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'INHIBITEURS DE COX-2 SUR LA PROLIFERATION DES DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES HEMATOLOGIQUES 89
FIGURE 19 : EVALUATION DE L'EFFET DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DES LIGNEES CELLULAIRE U937 ET K562 PAR MARQUAGE AU CFSE 93
FIGURE 20: EFFET DU NIMESULIDE ET DU CELECOXIB SUR L'INDEX MITOTIQUE DES CELLULES U937 94
FIGURE 21 : EVALUATION DE L'EFFET DES INHIBITEURS SPECIFIQUES DE COX-2 SUR L'APOPTOSE DES CELLULES U937 95
FIGURE 22: EFFET DU NIMESULIDE SUR LA DISTRIBUTION DU CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES U937 ET K562 98
FIGURE 23: EFFET DU NIMESULIDE SUR LA DISTRIBUTION DU CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES HEL, JURKAT ET RAJI 99
FIGURE 24: EFFET DU NS-398 SUR LA DISTRIBUTION DU CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES U937 ET K562 100
FIGURE 25: EFFET DU CELECOXIB SUR LA DISTRIBUTION DU CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES U937 ET K562 101
FIGURE 26 : ETUDE DE L'EXPRESSION DES CDKI DU CYCLE CELLULAIRE DANS LA LIGNEE K562 TRAITEE AVEC LE NIMESULIDE. 104
FIGURE 27 : ETUDE DE L'EXPRESSION DES CDKI DU CYCLE CELLULAIRE DANS LA LIGNEE U937 TRAITEE AVEC LE CELECOXIB. 106
FIGURE 28 : ETUDE DE L'EXPRESSION DE DIFFERENTS REGULATEURS DE LA TRANSITION G1/S DU CYCLE CELLULAIRE DANS LES LIGNEES U937 ET K562 TRAITEES PAR LE NIMESULIDE. 108
FIGURE 29 : ETUDE DE L'EFFET DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR L'EXPRESSION DE C-MYC DANS LES DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES 110
FIGURE 30 : ETUDE DE L'IMPLICATION DU PROTEASOME 26S DANS LA DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE C-MYC 112
FIGURE 31 : ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE SUR L'EXPRESSION DE C-MYC 113
FIGURE 32 : ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE LA STABILITE DE LA PROTEINE C-MYC DANS LES LIGNEES CELLULAIRES U937 TRAITEES PAR LE NIMESULIDE PENDANT 1H. 114
FIGURE 33 : ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE LA STABILITE DE LA PROTEINE C-MYC DANS LES LIGNEES CELLULAIRES U937 TRAITEES PAR LE NIMESULIDE PENDANT 24H. 115
FIGURE 34 : ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE LA STABILITE DE L'ARNM DE C-MYC DANS LES CELLULES U937 TRAITEES PENDANT 1H AVEC LE NIMESULIDE OU LE CELECOXIB. 117
FIGURE 35 : ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE LA STABILITE DE L'ARNM DE C-MYC DANS LES CELLULES U937 TRAITEES PAR LE NIMESULIDE OU LE CELECOXIB APRES 24H DE TRAITEMENT 118
FIGURE 36 : ETUDE DE L'EXPRESSION DE L'ARNM DE C-MYC DANS LES CELLULES U937 TRAITEES PAR LE NS-398 APRES 24H ET 48H DE TRAITEMENT 119
FIGURE 37 : ETUDE DE L'EXPRESSION DE C-MYC DANS LES LIGNEES CELLULES K562 TRAITEES PAR LES DIFFERENTS INHIBITEURS DE COX-2 120
FIGURE 38 : ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION DE ERK1/2 DANS LES CELLULES U937 TRAITEES PAR LE NIMESULIDE. 123
FIGURE 39 : ETUDE DES MIRS POUVANT POTENTIELLEMENT SE FIXER SUR LA REGION 3'NT DE L'ARNM C-MYC PAR L'ALGORITHME « TARGETSCAN ». 124
FIGURE 40 : EFFET DU NIMESULIDE ET DU CELECOXIB SUR L'EXPRESSION DE MIRS DE LA FAMILLE LET-7 125
FIGURE 41 : EVALUATION DE L'EXPRESSION DE COX-1 ET DE COX-2 126

FIGURE 42 : EVALUATION DE L'EXPRESSION DE P53 ET DE P73 127
FIGURE 43 : ETUDE DE L'EFFET DES PROSTAGLANDINES E2 SUR L'INHIBITION DE L'EXPRESSION DE C-MYC INDUITE PAR LE NIMESULIDE 129
FIGURE 44 : ETUDE DE L'EFFET DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR LA SYNTHESE DE PROSTAGLANDINES E2 130
FIGURE 45 : ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE ET DU CELECOXIB SUR L'EXPRESSION DE CD-11B, CD-14 ET DE CD-15 DANS LES CELLULES U937 134
FIGURE 46 : ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE ET DU CELECOXIB SUR L'EXPRESSION DE KI-67 DANS LES CELLULES U937 135
FIGURE 47 : ACTIVITE β-GALACTOSIDASE DES CELLULES U937 TRAITEES PAR LE NIMESULIDE 136
FIGURE 48 : OBSERVATIONS DES CELLULES U937 TRAITEES PENDANT 48H AVEC LE NIMESULIDE OU AVEC LE CELECOXIB137
FIGURE 49 : ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE ET DU CELECOXIB SUR L'EXPRESSION DE CD41A ET DE CD61 DANS LES CELLULES HEL ET K562 138
FIGURE 50 : ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE ET DU CELECOXIB SUR LA DIFFERENCIATION ERYTHROÏDE DES CELLULES HEL ET K562 139
FIGURE 51 : RECAPITULATIS DES RESULTATS OBTENUS SUR L'EFFET DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR LA PROLIFERATION ET LE CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES U937 140
FIGURE 52 : ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ETOPOSIDE 142
FIGURE 53: ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR PLUSIEURS AGENTS CHIMIOTHERAPEUTIQUES 144
FIGURE 54: EFFET DU NIMESULIDE SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR LE TNFα, FASL ET TRAIL 146
FIGURE 55: EFFET DU NS-398 SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR LE TNFα ET FASL 147
FIGURE 56 : ETUDE DE L'EFFET DU CELECOXIB ET DU DMC SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ETOPOSIDE 149
FIGURE 57 : ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE ET DU CELECOXIB SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR LE CISPLATINE DANS LES AUTRES LIGNEES HEMATOPOÏETIQUES. 151
FIGURE 58 : ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE ET DU NS-398 SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ETOPOSIDE DANS LES CELLULES K562 152
FIGURE 59: ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE SUR L'EXPRESSION DE XIAP 155
FIGURE 60 : ETUDE DE L'EFFET DU NS-398 SUR L'EXPRESSION DE MARQUEURS APOPTOTIQUES 156
FIGURE 61: ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE SUR LES EVENEMENTS MITOCHONDRIAUX INTERVENANT DURANT L'APOPTOSE 157
FIGURE 62 : ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE SUR L'ACTIVATION DE BAX INDUITE PAR L'ETOPOSIDE 159
FIGURE 63 : ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE SUR L'ACTIVATION DE BAK INDUITE PAR L'ETOPOSIDE 160
FIGURE 64: ETUDE DE L'EFFET DU NIMESULIDE SUR L'EXPRESSION DE PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES 162
FIGURE 65 : EFFET DU NIMESULIDE SUR L'ACTIVATION DE BAX ET BAK INDUITE PAR FASL 163
FIGURE 66 : EFFET DU NIMESULIDE SUR L'ACTIVATION DES JNK 1, 2/3 ET DE P38MAPK INDUITE PAR L'ETOPOSIDE 166
FIGURE 67 : EFFET DU NIMESULIDE SUR L'EXPRESSION ET LA PROTEOLYSE DE BCL-2 INDUITE PAR L'ETOPOSIDE 167
FIGURE 68 : EFFET DU NIMESULIDE ET DU NS-398 SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR LE H_2O_2 169
FIGURE 69 : EFFETS DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR LA PHOSPHORYLATION DE H2AX 170
FIGURE 70 : EFFETS DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR L'EXPRESSION DE CTR1 173
FIGURE 71 : EFFETS DES INHIBITEURS DE COX-2 DU NIMESULIDE ET DU NS-398 SUR LE NIVEAU INTRACELLULAIRE DE RHODAMINE 123 174
FIGURE 72 : EFFET DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR L'EXPRESSION DE MRP-1 ET DE MDR-1 175
FIGURE 73 : EFFET DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR L'EXPRESSION DE MDR-1 ET MRP-1 176
FIGURE 74 : EFFET DU NIMESULIDE ET DU CELECOXIB SUR LA MASSE LYSOSOMIALE DES CELLULES U937 178
FIGURE 75 : RECAPITULATIF DES RESULTATS CONCERNANT L'EFFET DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR L'APOPTOSE DES CELLULES U937 179
FIGURE 76 ETUDE DE L'EFFET DE LA CURCUMINE SUR L'APOPTOSE DES DIFFERENTES LIGNEES HEMATOPOÏETIQUES 181
FIGURE 77 ETUDE DE L'EFFET DE LA CURCUMINE SUR L'APOPTOSE DES DIFFERENTES LIGNEES HEMATOPOÏETIQUES 182
FIGURE 78 : ETUDE DE L'EFFET DE LA CURCUMINE SUR LE CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES U937 184
FIGURE 79 : ETUDE DE L'EFFET DE LA COMBINAISON CELECOXIB / CURCUMINE SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES U937 ET K562 187
FIGURE 80 : ETUDE DE L'EFFET D'UN PRETRAITEMENT DE CELECOXIB SUR L'ACCUMULATION EN PHASE S ET G2/M INDUITE PAR LA CURCUMINE 188
FIGURE 81 : ETUDE DE L'EFFET D'UN PRETRAITEMENT DE CELECOXIB SUR L'APOPTOSE DES CELLULES U937 ET K562 INDUITE PAR LA CURCUMINE 189
FIGURE 82 : MODELE D'ACTION DE LA COMBINAISON CELECOXIB / CURCUMINE DANS LES CELLULES U937 190
FIGURE 83: EFFET DU CELECOXIB SUR L'APOPTOSE DES DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRE LEUCEMIQUES ET LYMPHOBLASTIQUES 192

FIGURE 84: EFFET DU 2,5-DIMETHYL-CELECOXIB SUR L'APOPTOSE DES DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES LEUCEMIQUES ET LYMPHOBLASTIQUES. 194
FIGURE 85 : EVALUATION DE L'EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN 2,5-DIMETHYL-CELECOXIB SUR LA PROLIFERATION ET L'APOPTOSE DES LIGNEES CELLULAIRES U937 ET K562. 195
FIGURE 86 : ACTION DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DES CELLULES CANCEREUSES HEMATOPOÏETIQUES : UN MODELE 206
FIGURE 87 : MODELE D'ACTION DES INHIBITEURS DE COX-2 SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR UN STRESS (AGENTS CHIMIOTHERAPEUTIQUES) 213
FIGURE 88 : EFFET DU CELECOXIB SUR LA DISTRIBUTION DES ARNS DANS LES POLYSOMES 222

Tableaux

TABLEAU 1 : CARACTERISTIQUES DES MEMBRES DE LA FAMILLE CYCLOOXYGENASE. 20
TABLEAU 2 : CLASSIFICATION DES INHIBITEURS DE COXS 27
TABLEAU 3 : CLASSIFICATION SIMPLIFIEE DE QUELQUES AGENTS CHIMIOTHERAPEUTIQUES 59
TABLEAU 4 : COMPOSES UTILISES POUR LE TRAITEMENT DES DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES. 68
TABLEAU 5 : ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES POUR LES EXPERIENCES DE WESTERN BLOT 74
TABLEAU 6: SEQUENCES DES OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LES EXPERIENCES D'AMPLIFICATION PAR PCR 78
TABLEAU 7: SEQUENCES DES OLIGONUCLEOTIDES UTILISES POUR LES EXPERIENCES D'AMPLIFICATION PAR PCR POUR LES MIRS. 80
TABLEAU 8 : RECAPITULATIF DES ANALYSES DE PCR EN TEMPS REEL DES ACTEURS DE LA TRANSITION G1/S DU CYCLE CELLULAIRE 107

Liste des abréviations

AA	acide arachidonique
ABC	ATP binding casette
ABL1	abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
Act D	actinomycine D
ADN	acide désoxyribonucléique
AIF	apoptosis inducing factor
AINS	anti-inflammatoire non steroïdien
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AP-1	activator protein-1
APAF	apoptosis protease activating factor
APC	anaphase promoting complex
ARE	AU-Rich Element
ARN	acide ribonucléique
ASB	albumine sérique bovine
ATG	autophagy genes
ATM	ataxia-telangiectasia-mutated
ATP	adénosine Triphosphate
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
AUBP	AU-binding proteins
Bad	Bcl-associated death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
β-cat	Beta-caténine
β-gal	Beta-galactosidase
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Bcr	breakpoint cluster region
BH	Bcl-2 homology
Bid	Bcl-2 interacting domain
cAMP	cyclic adenosin monophosphate
CAK	Cdk activating kinase
CDC25	cell division cycle 25
CDC25C	cell division cycle 25 C
Cdk	cyclin dependent kinase
Cdki	cyclin dependent kinase inhibitor
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CFSE	carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester
CFU-GM	colony forming unit granulocyte macrophage progenitor
Chk1	check point kinase 1
Chk2	check point kinase 2
CIS	cisplatine
COX(s)	cyclooxygénase(s)
COXib	célécoxib
CpG	cytosine phosphodiester bond guanine
CRE	c-AMP responsive element
CREB	c-AMP responsive element binding

C-term	carboxy-terminale
CTR1	copper transporter 1
Cyt c	cytochrome c
DED	death effector domain
DEPC	Diéthyl pyrocarbonate
DISC	death-inducing signaling complex
DMC	2,5-dimethyl-célécoxib
DMSO	diméthylsulfoxyde
DNMT	DNA methyl transferase
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DP	D series of prostaglandin receptor
E2F	elongation 2 factor
EBV	epstein Barr Virus
EGCG	epigallocatechin gallate
EGF	epithelial growth factor
EGFR	epithelial growth factor receptor
ELISA	Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay
EP	E series of prostaglandin receptor
ERAD	endoplasmic reticulum associated protein degradation
Erb	erythroblastic leukemia viral oncogene
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas associated death domain
FasL	ligand Fas
FBW7	F-box and WD (tryptophan-aspartic acid) repeat domain-containing 7
GFR	growth factor receptor
GPCR	G protein-coupled receptor
GSH	glutathion
GSTP1	glutathionne *S*-transférase
H2AX	histone H2A
HDAC	histone deacetylase
HER	human epidermal growth factor receptor
HRP	horseradish peroxidase
HuR	human antigen R
IAP	inhibitor of apoptosis
IFN	interferon
IGF	insulin growth factor
IκB	inhibitor of kappa B
IKK	IκB kinase
IL	interleukine
IP	I series of prostaglandin receptor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LC3	light-chain-3
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LPS	lipopolysaccharide
LTB4	leukotriène B4
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
MAPK	mitogen activated protein kinase
MB1	Myc box 1
MDR	multidrug resistance
MGG	May-Grünwald Giemsa

MIP	macrophage inflammatory protein
miR(s)	microARN(s)
MALT	mucosa-associated lymphoid tissue
Mdm2	murine double minute
MDR1	multidrug resitance protein 1
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP	matrix metalloproteinase
MMR	mismatch repair
MOMP	mitochondrial outer membrane potential
MRP	multidrug resistance-associated protein
mTOR	mammalian target of rapamycine
MyD88	myeloid differentiation primary response gene
NAP	neutrophil activating protein
NFIl6	nuclear factor for Il-6
NGF	nerve growth factor
NFκB	nuclear factor kappa B
Nime	nimésulide
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
3’NT	région 3’ non traduite
PARP	poly (ADP ribose) polymérase
PDK1	pyruvate deshydrogenase kinase
PEST	proline, acide glutamique, sérine, thréonine
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS tween
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
p38MAPK	p38 mitogen activated protein kinase
PGE2	prostaglandine E2
PGH2	prostaglandine H2
PGI2	prostaglandine I2
PGJ2	prostaglandine J2
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIP3	phosphatidyl-isositol-triphosphate
PIP2	phosphatidyl-isositol-biphosphate
PKA	protein kinase A
PKB	protein Kinase B
PKC	protein kinase C
PLA2	phospholipase A2
PMA	phorbol 12-myristate 13-acétate
PP2A	protein phosphatase 2
pRb	retinoblastoma protein
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	phosphatase and TENsin homolog
PTP	pore de transition de perméabilité
RNase	ribonucléase
RNU6B	RNA, U6B small nuclear
ERO	espèces réactives de l’oxygène
SAHF	senescence-associated heterochromatin foci
SAPK	stress activated protein kinase

SDS-PAGE	SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Smac	second mitochondria-devided activator of caspases
Src	sarcoma tyrosine kinase
STAT	signal transducer and activator of transcription
SVF	sérum de veau foetal
TLR	toll like receptor
TGF-β	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TP	T series of prostaglandin receptor
TRADD	TNF receptor associated death domain
TRAF 6	TNF receptor associated factor 6
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TTP	tristetraproline
TxA2	thromboxane A2
UV	ultraviolets
UVB	ultraviolets B
VEGF	vascular endothelial growth factor
1,25D	1,25-dihydroxyvitamin D3
Wnt	Wingless-int
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein : protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

1 INTRODUCTION

1.1 Inflammation et cancer

1.1.1 Les cancers

Le cancer est une maladie associée à une prolifération cellulaire anormale et anarchique au sein d'un tissu normal de l'organisme ainsi qu'à une diminution de la sensibilité aux stimuli pro-apoptotiques.

Les cellules tumorales sont caractérisées par de nombreuses anomalies qui conduisent à la formation d'une tumeur. Six caractéristiques des cellules tumorales sont connues depuis longtemps. Il s'agit notamment d'une prolifération cellulaire incontrôlée, de l'acquisition d'une immortalité, une capacité à induire la néoangiogenèse , une capacité de formation de métastases, une résistance à la mort cellulaire programmée, une capacité à échapper aux gènes suppresseurs de tumeurs (Hanahan *et al.* 2011). Cependant, l'identification des caractéristiques tumorales est en constante évolution et ainsi quatre caractéristiques supplémentaires ont récemment été décrites (Hanahan and Weinberg 2011). Il s'agit de la perturbation du métabolisme énergétique, de l'instabilité génomique, de la capacité des cellules tumorales à échapper au système immunitaire et du lien entre l'inflammation et la promotion tumorale.

Différents types de cancers peuvent être distingués selon la nature du tissu atteint. Ainsi, s'il s'agit de cellules épithéliales, le terme « carcinome » est utilisé pour désigner la tumeur. S'il s'agit de tissu de soutien (tissus conjonctifs), de tissus osseux, cartilagineux ou musculaire le terme « sarcome » est employé. Le cancer peut aussi affecter les cellules du sang et ces cancers regroupent les lymphomes et les leucémies (ou leucoses). D'après les données de l'observatoire européen du cancer de 2008 (Figure 1), les lymphomes et les leucémies étaient encore parmi les cancers les plus fréquents en Europe. D'autres part, l'incidence de ces cancers est encore associée à un taux de mortalité élevé, d'où l'intérêt de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

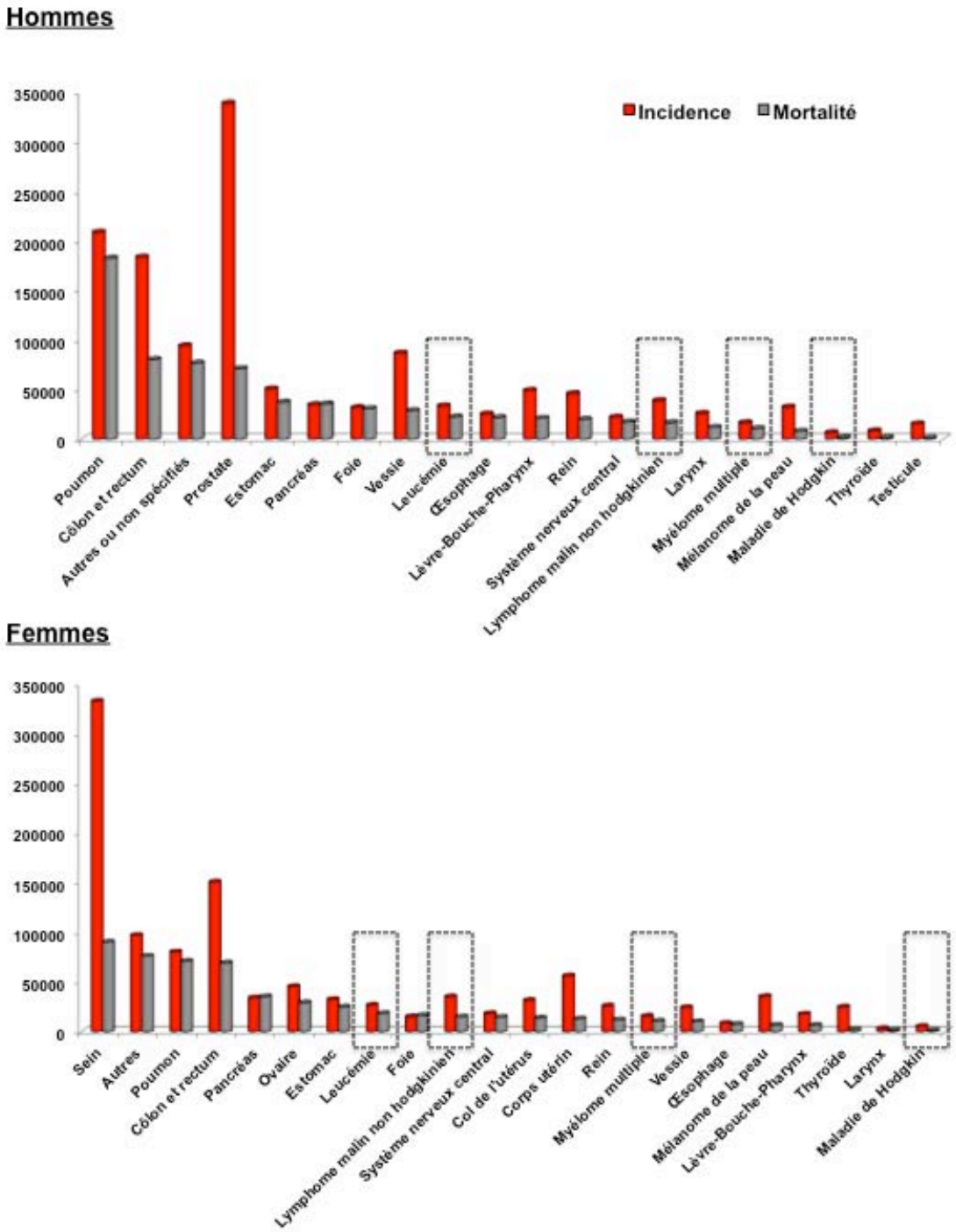


Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers en Union Européenne en 2008

Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers les plus fréquents chez les hommes et les femmes en Union européenne en 2008. Le taux est standardisé sur l'âge par 100.000. Les données proviennent de l'Observatoire Européen du Cancer (http://eu-cancer.iarc.fr/?lang=1). Les encadrés désignent les cancers du sang (leucémies, lymphomes et myélomes multiples).

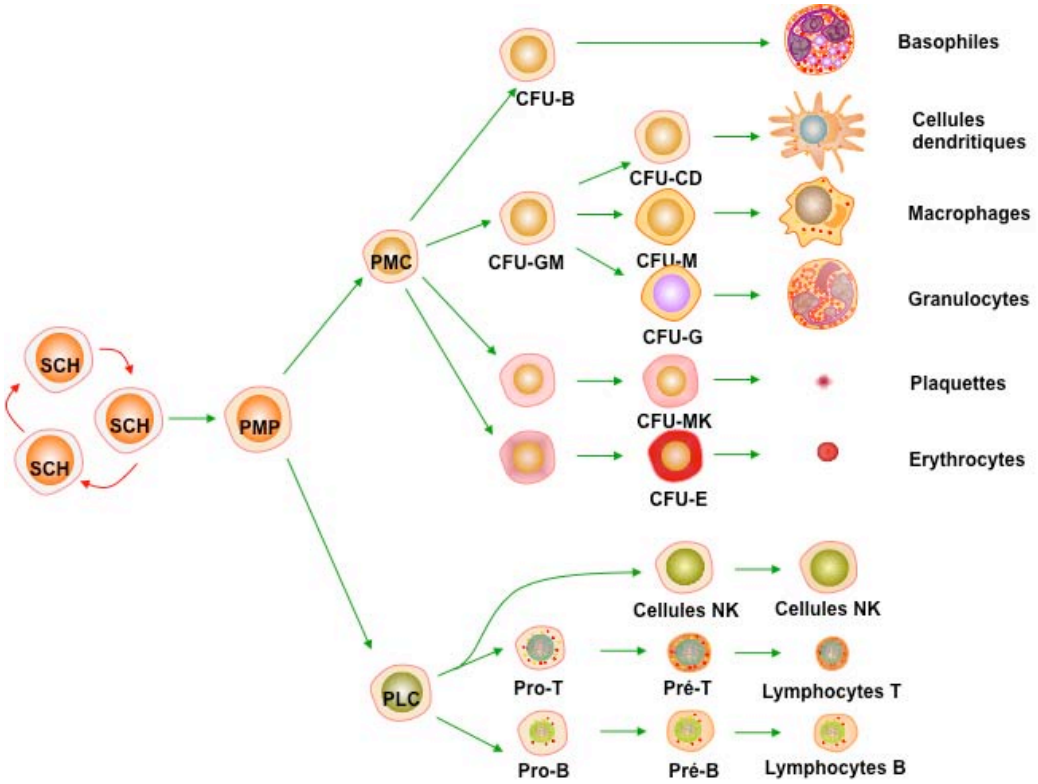


Figure 2 : L'hématopoïèse et les leucémies

(D'après Buck et al., 2009 avec modifications)

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui conduisent à la fabrication et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines. Ce mécanisme se déroule dans la moelle osseuse et fait intervenir des cellules souches hématopoïétiques (SCH) mais aussi des progéniteurs multipotents (PMP), des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes communs (PMC et PLC), des progéniteurs B/T (pour lymphocytes B ou T), des progéniteurs granulo-macrophagiques CFU-GM (colony forming unit granulocyte macrophage progenitor). La leucémie est une maladie de l'hématopoïèse. La classification des leucémies repose sur le stade de différenciation des cellules tumorales. Les leucémies peuvent être myéloïdes ou lymphoïdes.

NK : Nuclear Killer

C'est en 1847 que Rudolf Virchow, un histologiste allemand, a parlé de leucémie pour la première fois (Balkwill *et al.* 2001). La différence entre les leucémies et les lymphomes réside dans le fait que les leucémies commencent dans la moelle osseuse alors que les lymphomes sont des cancers qui se déclarent dans les aires lymphoïdes secondaires, des zones importantes pour l'activation de la réponse immunitaire (*par exemple*, la rate, le thymus).

Les leucémies sont caractérisées par une prolifération anarchique des précurseurs des cellules sanguines qui conduit à une perturbation de l'hématopoïèse, c'est-à-dire le mécanisme de production des cellules du sang qui se déroule dans la moelle osseuse. Les leucémies sont donc caractérisées par une anémie, une neutropénie (déficit en polynucléaires) et une thrombopénie (déficit en plaquettes). Ces déficiences augmentent le risque d'infections mais aussi d'hémorragies. Les leucémies sont classées en fonction du stade et du niveau de différenciation de ces précurseurs (Figure 2). Les leucémies lymphoïdes concernent les cellules lymphocytaires alors que les leucémies myéloïdes concernent les cellules granuleuses. Les leucémies sont qualifiées d'aiguës si la prolifération des cellules leucémiques est rapide. Cette rapidité peut être liée à un stade de différenciation précoce. Par contre, si la prolifération des cellules leucémiques est lente, la leucémie est qualifiée de chronique. Cette différence avec la leucémie aiguë peut s'expliquer si le stade de différenciation des cellules tumorales est avancé. Ainsi, quatre types de leucémies peuvent être distingués :

- la leucémie myéloïde aiguë, atteignant plus souvent l'adulte que l'enfant (Pollyea *et al.* 2011).

- la leucémie myéloïde chronique qui est souvent caractérisée par un la présence d'un chromosome particulier dénommé « chromosome de Philadelphie » résultant d'une translocation entre le chromosome 9 et 22 (De Braekeleer *et al.* 2011). Ce type de leucémie peut se transformer après quelques années en leucémie myéloïde aiguë. La présence du chromosome de Philadelphie n'est pas un critère exclusif de la leucémie myéloïde chronique et peut être détectée dans d'autres types de leucémies comme par exemple la leucémie lymphoïde aiguë (De Braekeleer, Douet-Guilbert et al. 2011).

- la leucémie lymphoïde aiguë est le type le plus courant de leucémie chez les enfants.

- les leucémies lymphoïdes chroniques qui atteignent le plus souvent les adultes.

Les lymphomes sont caractérisés selon la présence ou non de cellules appelées « cellules de Reed Sternberg ». Il s'agit de cellules malignes d'origine lymphoïde B

(Yurchenko *et al.* 2010) dont le profil d'expression génique est fortement perturbé. Si ces cellules sont présentes dans la tumeur, le terme de « lymphome Hodgkinien » est utilisé (Kuppers 2009). Si ces cellules sont absentes, il s'agit de lymphomes dits « non Hodgkiniens ». Les lymphomes de Burkitt par exemple sont des lymphomes non Hodgkinien. Les lymphomes de MALT (mucosa associated lymphoid tissue) et du manteau sont aussi des lymphomes de ce type.

Les cellules cancéreuses possèdent de nombreuses caractéristiques spécifiques notamment des caractéristiques morphologiques avec des anomalies nucléaires (augmentation du ratio nucléocytoplasmique, présence de plusieurs noyaux) et des anomalies cytoplasmiques (aspect basophile du cytoplasme, anisocytose). Ces caractéristiques morphologiques ne sont pas obligatoires car une cellule cancéreuse peut avoir une morphologie normale. Par ailleurs ces anomalies peuvent aussi être retrouvées dans des cellules non cancéreuses lors de processus comme par exemple l'inflammation (Hussain *et al.* 2007).

Des anomalies de la croissance et de la prolifération cellulaire sont aussi observées avec une perte de l'inhibition de contact, une diminution de la cohésion entre les cellules tumorales, une capacité d'invasion en induisant la néoangiogenèse et en diminuant l'expression de protéines d'adhésion. L'immortalisation ainsi que la dédifférenciation des cellules sont aussi des caractéristiques des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg 2011).

Les cellules tumorales possèdent aussi des anomalies génétiques notamment des anomalies chromosomiques (monosomies, trisomies), structurales (translocations, délétions) et de la ploïdie (aneuploïdie, haploïdie). Les leucémies myéloïdes chroniques sont par exemple caractérisées par la fusion du gène ABL1 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) du chromosome 9 avec le gène Bcr (breakpoint cluster region) situé sur le chromosome 22, formant ainsi le chromosome de Philadelphie (Lozzio *et al.* 1975; McGahon *et al.* 1994). Les lésions du matériel génétique peuvent cibler des gènes impliqués dans la cancérogenèse comme des proto-oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs ou d'autres gènes régulant la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence cellulaire et perturber certaines voies de signalisation intracellulaires en inhibant des voies antiprolifératives et en activant de manière constitutive les voies de signalisation des facteurs de croissance (*par exemple*, MAPK : mitogen activated protein kinase). Par ailleurs, ces altérations peuvent aussi toucher les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Le syndrome de Lynch, par exemple, est associé à des mutations des gènes MMR (mismach repair) impliqués dans la réparation de l'ADN (Martin *et al.* 2010).

La cancérogenèse peut avoir plusieurs origines. Les cellules peuvent être exposées à des carcinogènes chimiques comme (1) les espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2, O_2^-) générées par le métabolisme cellulaire (carcinogènes chimiques endogènes), (2) les carcinogènes génotoxiques exogènes comme le benzène (Cogliano *et al.* 2011), (3) les agents alkylants ou (4) les métaux lourds (plomb, cadmium) (Hartwig 2010). Il peut aussi s'agir de carcinogènes physiques comme les radiations UV (ultraviolets) ou des carcinogènes biologiques (viraux) (No *et al.* 2011). En effet, les virus peuvent comporter des oncogènes, des facteurs transactivateurs de proto-oncogènes ou des gènes codant pour des protéines inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs. Par ailleurs, l'insertion de l'ADN viral dans le génome de la cellule-hôte peut perturber l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (insertion de l'ADN viral dans le promoteur). C'est par exemple le cas des papillomavirus qui sont impliqués dans le cancer du col de l'utérus (No, Kim et al. 2011) ou encore du lymphome de Burkitt qui est provoqué par le virus d'Epstein Barr (EBV) et conduit à une surexpression de l'oncogène c-Myc (Pulvertaft 1974). Le sarcome de Kaposi, qui est fréquemment observé chez les personnes immunodéprimées est aussi un cancer provoqué par un virus de la famille Herpes (HHV8) (Mesri *et al.* 2010).

1.1.2 Lien entre l'inflammation et le cancer

L'inflammation, réaction majeure de l'immunité naturelle, est un mécanisme de défense contre des agents pathogènes, l'irritation ou les lésions. Elle est induite par des bactéries ou produits de dégradation de bactéries (*par exemple,* les lipopeptides), de champignons et de virus (Kulinsky 2007). Ces produits de dégradation sont détectés par des récepteurs Toll présents sur des cellules immunitaires (*par exemple,* les macrophages) (Kulinsky 2007). Leur activation va être responsable de l'activation d'une cascade de signaux intracellulaires avec notamment l'activation du facteur de transcription NF-κB (nuclear factor κB) (Aggarwal 2004), des MAPK (mitogen activated protein kinase), notamment SAPK (stress-activated protein kinase) comme par exemple la p38MAPK. Ces signaux régulent l'expression de différents gènes cibles, comme ceux qui contrôlent l'expression de différentes cytokines pro-inflammatoires tel que le TNFα (tumor necrosis factor alpha), l'IL-1 (interleukine-1), l'IL-6 (interleukine-6), le TGF-β (transforming growth factor beta) ou encore des facteurs de croissance mais aussi des molécules d'adhésion (*par exemple,* les intégrines). Les cytokines produites ont des effets paracrines, autocrines et pléiotropes (Figure 4). Elles

ont des effets importants sur les propriétés adhésives de l'endothélium et permettent aux leucocytes du système circulatoire d'adhérer aux cellules endothéliales, favorisant ainsi la diapédèse, un mécanisme permettant aux cellules immunitaires de s'insinuer entre les cellules endothéliales pour atteindre le foyer inflammatoire. L'inflammation fait aussi intervenir des chimiokines (*par exemple,* l'IL-8) qui sont produites par les leucocytes et l'endothélium et qui sont indispensables au recrutement des cellules immunitaires au niveau du site inflammatoire (Coussens *et al.* 2002). Celles-ci agissent sur les neutrophiles comme l'Il-8, NAP (neutrophile activating protein), des chimiokines agissant sur les éosinophiles (*par exemple,* l'éotaxine), sur les monocytes (monocyte chemotaxis protein), sur les macrophages (macrophage inflammatory protein) (Kulinsky 2007). Les chimiokines sont nécessaires à la maturation et à l'activation des cellules, mais aussi à la différenciation des cellules immunitaires, à la migration des cellules immunitaires vers le site infectieux, à l'angiogenèse et à la production de collagène pour la régénération tissulaire (Kulinsky 2007).

L'inflammation induit par ailleurs la production d'autres protéines comme la phospholipase-A2 (PLA2), qui est responsable de la libération d'acide arachidonique (AA). L'inflammation stimule aussi l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2), une enzyme qui est responsable de la production de prostaglandines (Wang *et al.* 2005; Kulinsky 2007) à partir de l'AA. COX-2 est induite par plusieurs cytokines pro-inflammatoires mais aussi directement par les éléments déclencheurs de l'inflammation comme les bactéries, les virus, les lipopolysaccharides (LPS). Les prostaglandines produites par cette enzyme jouent un rôle important dans la réponse immunitaire. (Harris *et al.* 2002). La prostaglandine E2 (PGE2) inhibe la prolifération des lymphocytes T. La PGE2 possède aussi une activité inhibitrice de la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules dendritiques, comme par exemple l'IL-1β ou encore le TNFα. Cependant, la PGE2 peut aussi stimuler la production l'IL-10 et d'IL-12 par les macrophages (Harris, Padilla et al. 2002).

Francis Peyton Rous fut le premier à reconnaître que les cancers se développent à partir d'une cellule « initiée » ayant subi des mutations lui conférant des propriétés néoplasiques. L'initiation, phase au cours de laquelle une cellule normale subit des mutations sous l'effet de carcinogènes, est irréversible et peut persister dans le tissu après un autre type de stimulation appelée la promotion tumorale (Figure 3). La promotion est caractérisée par la prolifération clonale des cellules initiées qui est due à l'exposition de ces cellules à des promoteurs tumoraux stimulant la prolifération de ces cellules (*par exemple,* le Phorbol 12-myristate 13-acétate, PMA) à des hormones (*par exemple,* les oestrogènes), ou bien à des

cytokines lors d'une situation d'inflammation chronique (Coussens and Werb 2002; Hussain and Harris 2007).

La relation entre cancer et inflammation chronique a été suggérée pour la première fois en 1863 par Rudolph Virchow qui a observé la présence de leucocytes dans les tissus cancéreux et émis l'hypothèse que l'inflammation chronique pouvait promouvoir le développement tumoral (Balkwill and Mantovani 2001). Bien que les premières évidences d'une relation entre le cancer et l'inflammation remontent à environ un siècle, ce lien a seulement été étudié récemment et a permis de démontrer que l'incidence de plusieurs cancers est associée à une inflammation chronique, comme par exemple le cancer du côlon, du sein, ou encore de la prostate (Li *et al.* 2001; Coussens and Werb 2002; Dennis *et al.* 2002 ; Howe 2007).

Le microenvironnement tumoral est peuplé par de nombreuses cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les lymphocytes ou les macrophages. La présence de ces cellules dans le stroma tumoral est un autre argument en faveur d'un lien entre l'inflammation et le cancer. Ces cellules sont responsables de la libération de plusieurs cytokines qui jouent un rôle dans l'incidence tumorale tout en stimulant la prolifération cellulaire et en inhibant la mort des cellules tumorales (Kulinsky 2007). Plusieurs études ont montré le rôle de ces cytokines. La surexpression du TNFα par exemple dans des souris transgéniques atteints d'un cancer du poumon est corrélée à une augmentation du volume et de l'agressivité tumorale (Suganuma *et al.* 1999). En temps normal, l'inflammation est un processus régulé et il y a production de cytokines anti-inflammatoires pour freiner l'inflammation après élimination des facteurs déclencheurs. L'inflammation chronique serait liée à une persistance des facteurs déclencheurs de l'inflammation ou à un défaut des mécanismes nécessaires pour l'arrêter comme par exemple des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-10 ou encore l'IL-13. Le TGF-β est aussi une cytokine anti-inflammatoire et immunosuppressive avec un effet antitumoral dans le cancer du côlon chez l'Homme (Howe 2007). Les cellules tumorales produisent aussi des cytokines et des chimiokines (*par exemple*, l'IL-6) (Balkwill and Mantovani 2001 ; Coussens and Werb 2002 ; Fukuyama *et al.* 2007). Celles-ci vont attirer les leucocytes (neutrophiles, cellules dendritiques, macrophages, éosinophiles, mastocytes, lymphocytes) qui vont infiltrer la tumeur et se trouver dans le stroma tumoral (Vakkila *et al.* 2004). Les leucocytes produisent ensuite des cytokines comme l'IL-8, le TNFα, des espèces réactives de l'oxygène (ERO), des protéases et des chimiokines dont le but est de renforcer la réaction inflammatoire. Ce mécanisme va jouer différents rôles sur le développement

tumoral. Le TNFα, l'IL-1β, l'IL-6 peuvent par exemple induire le développement tumoral par induction de gènes dépendant du facteur de transcription NF-κB (Suganuma, Okabe et al. 1999; Pikarsky *et al.* 2004) comme par exemple la protéine B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), un facteur de survie cellulaire ou encore des gènes de prolifération comme c-Myc par exemple (Keller *et al.* 2005).

Les nombreuses cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral et les nombreuses voies de signalisation activées par ces cytokines conduisent à une augmentation de l'expression de COX-2 (Tsatsanis *et al.* 2006). Comme expliqué précédemment, COX-2 joue un rôle important durant l'inflammation. Les études menées sur les inhibiteurs de cette enzyme, notamment sur les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), ont démontré une diminution de l'incidence de ces cancers en diminuant la prolifération et l'invasion des cellules tumorales (Vakkila and Lotze 2004 ; Yao *et al.* 2004). Des études récentes ont montré que l'usage chronique de l'aspirine réduit le risque de développer un cancer colorectal (Fuchs 2011; Zubiaurre *et al.* 2011).

Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs plus spécifiques de COX-2 comme par exemple le célécoxib (Steinbach *et al.* 2000) a diminué l'incidence des cancers colorectaux (*par exemple,* la Polypose Adénomateuse Familiale). Ces données bibliographiques ont donc montré que les COXs jouent un rôle central dans le lien entre l'inflammation chronique et le développement tumoral.

1.1.3 Les cyclooxygénases

Les COXs (ou, prostaglandine-endoperoxyde synthase) sont des enzymes de la famille des myéloperoxydases (Chandrasekharan et Simmons, 2004) impliquées dans le métabolisme de l'AA qui est libéré de la membrane plasmique par les phospholipases et majoritairement par la PLA2 (Gonzalez-Periz *et al.* 2007) (Figure 5).

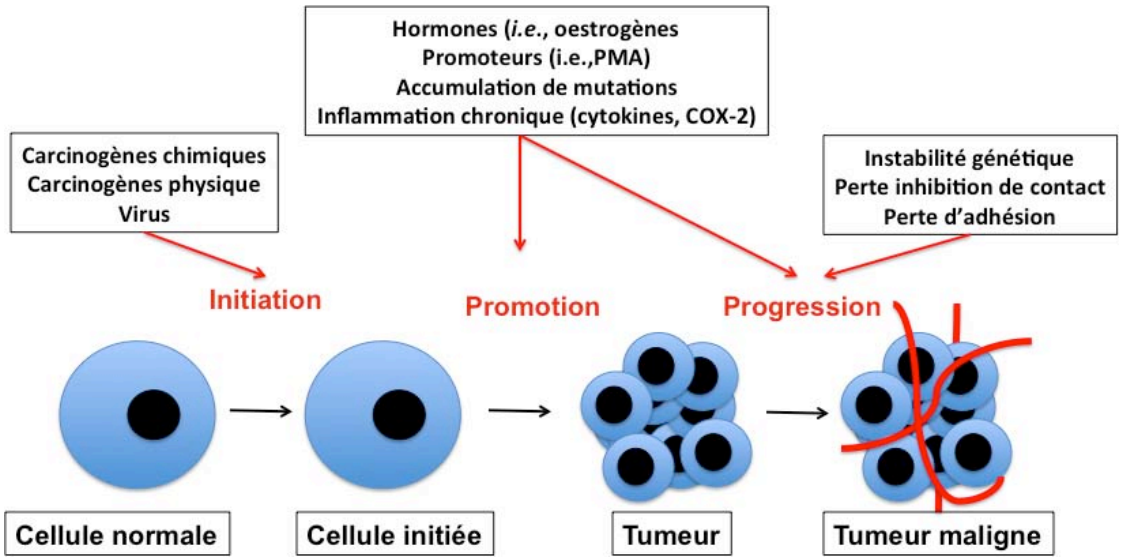


Figure 3: Les différentes étapes de la cancérogenèse.

L'initiation tumorale par des agents cancérogènes est irréversible et peut persister dans le tissu après la promotion qui est due à l'exposition des cellules initiées à des molécules irritantes, à des hormones, ou bien à une situation d'inflammation. Parmi les agents initiateurs, il y a les carcinogènes chimiques avec notamment les EROs (H_2O_2, $O_2^{\cdot-}$) issues du métabolisme cellulaire et qui induisent un stress oxydant, mais aussi des carcinogènes génotoxiques exogènes comme le benzène, des agents alkylants, des métaux (plomb, cadmium). Il s'agit d'autre part des carcinogènes physiques comme les radiations ionisantes *(par exemple*, les rayons ultraviolets) ainsi que des carcinogènes viraux. Les virus peuvent comporter des oncogènes, des facteurs transactivateurs de proto-oncogènes, des gènes codant pour des protéines inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs. L'insertion d'ADN viral dans le génome de la cellule hôte peut perturber l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (insertion de l'ADN viral dans le promoteur).

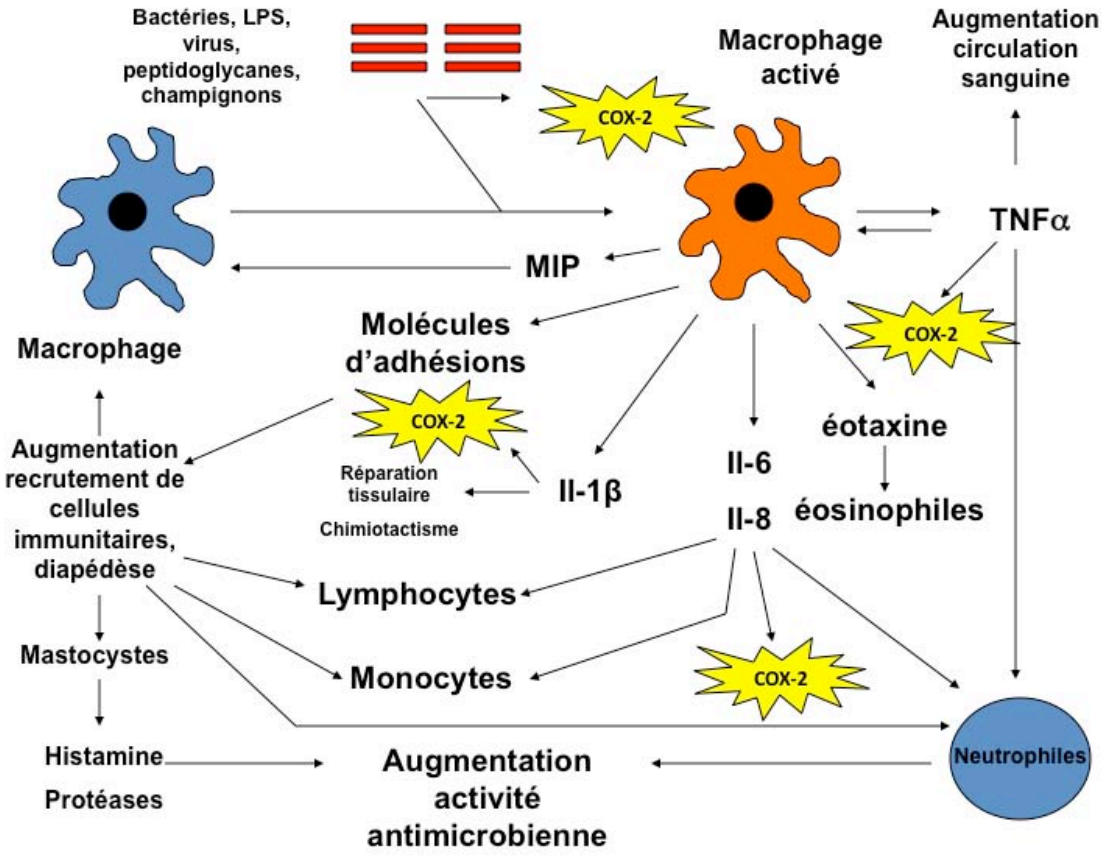
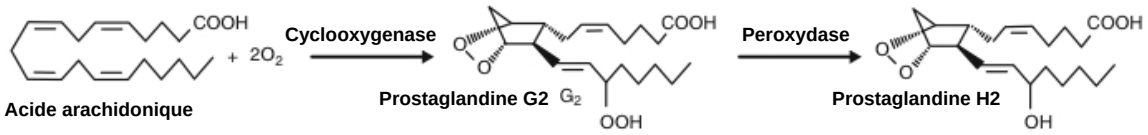


Figure 4 : Mécanismes simplifiés de l'inflammation

(D'après Kulinsky., 2007)

L'inflammation est un processus séquentiel: les neutrophiles sont les premières cellules recrutées. Puis les monocytes qui se différencient en macrophages migrent à leur tour vers le site inflammatoire, guidés par les chimiokines. Les macrophages activés sont les principales sources de facteurs de croissance et de cytokines dans le microenvironnement local. Les mastocytes jouent églament un rôle important dans l'inflammation grâce à la libération de médiateurs comme l'histamine, des cytokines et des protéases. IL: Interleukine ; LPS: Lipopolysaccharide ; MIP: Macrophage inflammatory protein ; TNFα : Tumor necrosis factor alpha.

A



B

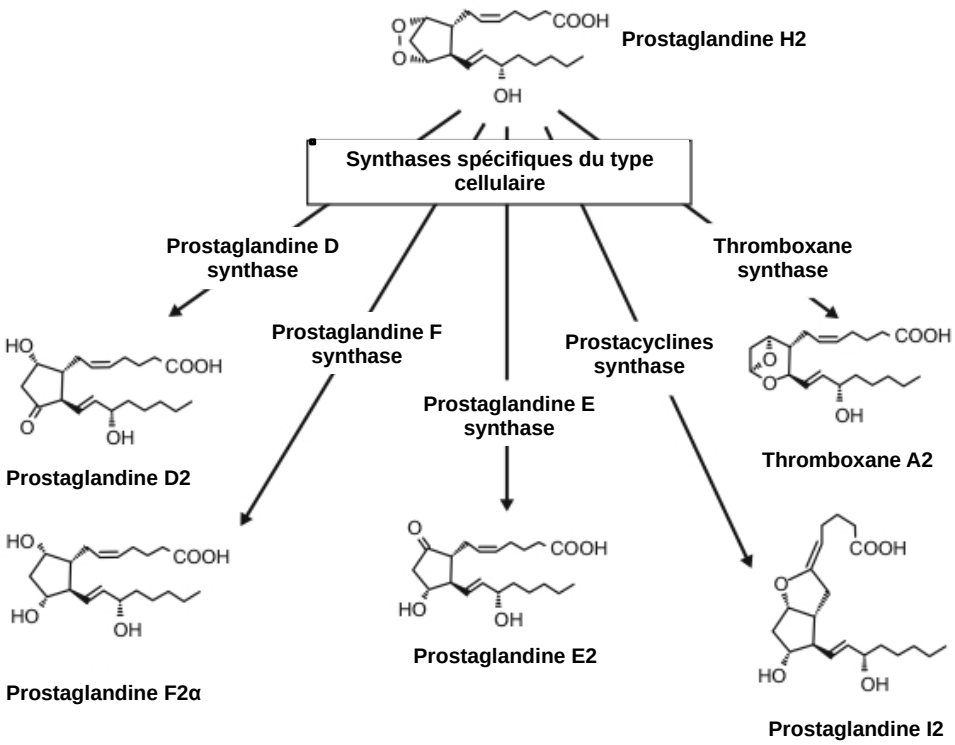


Figure 5 : Métabolisme de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases

(D'après Howe., 2007)

Les COXs convertissent dans un premier temps l'AA en endoperoxyde cyclique par leur fonction cyclooxygénase puis forment de la PGH2 grâce à la fonction peroxydase de l'enzyme (**A**). La PGH2 est ensuite convertie en plusieurs prostaglandines et en thromboxanes par différentes synthases (**B**) qui jouent des rôles divers dans l'inflammation, la fièvre, la douleur ou l'angiogenèse.

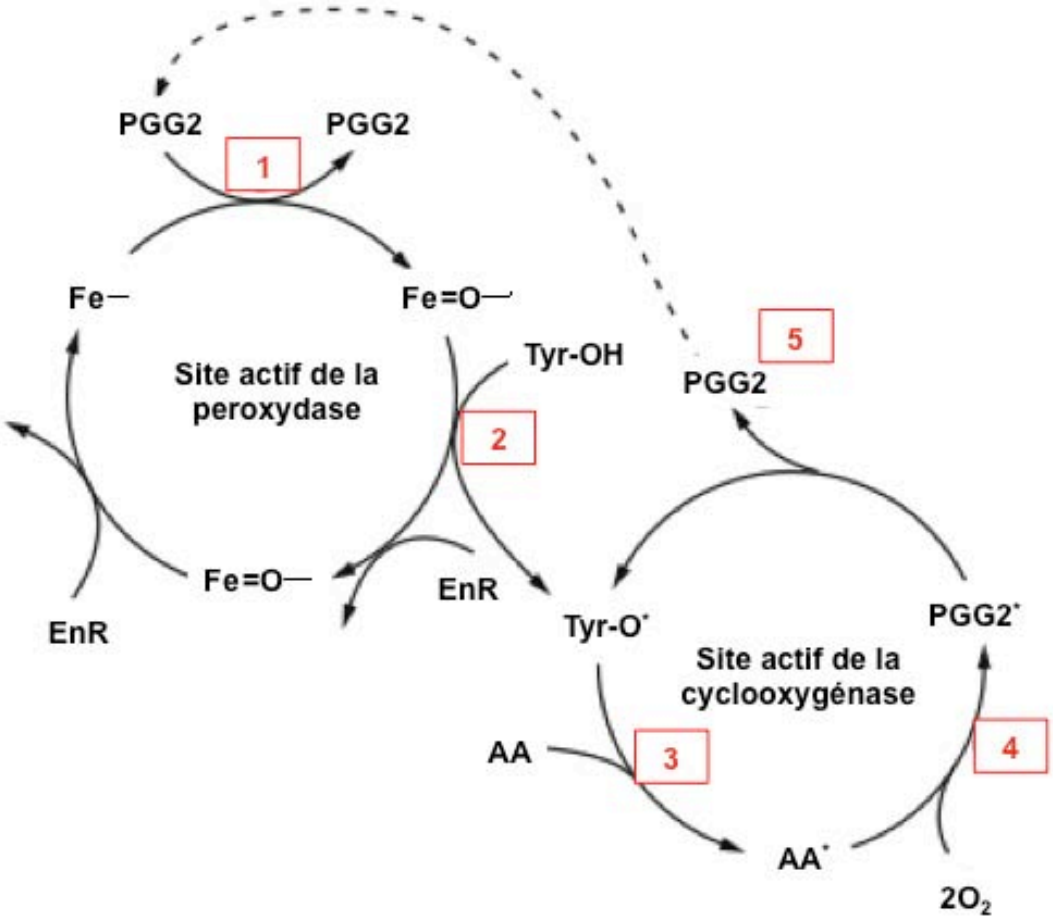


Figure 6 : Métabolisme de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases

(D'après Howe, 2007, avec modifications)

Les activités cyclooxygénase et peroxydase sont interconnectées. COX-1 est d'abord activée au niveau de la tyrosine 384 (COX-2 : tyrosine 371). La réaction aboutit à la formation d'un radical tyrosyle (Tyr-O˙) qui met en jeu l'hème du site peroxydase (Fe=O). Puis le radical tyrosile réagit avec l'acide arachidonique et conduit à la formation d'un radical trachydonyle qui réagit avec deux molécules d'oxygène pour former la prostaglandine G2 (PGG2). EnR : endoplasmic reticulum.

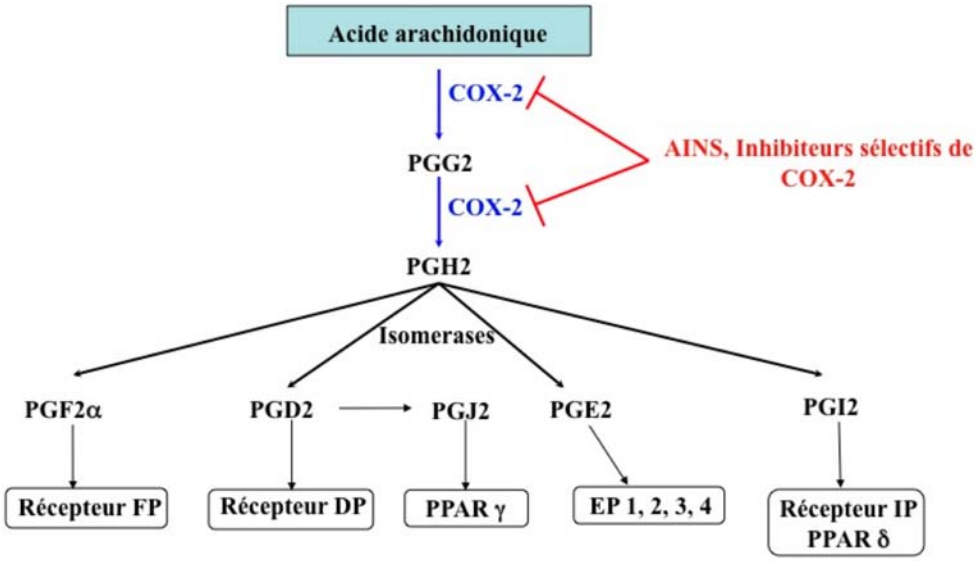


Figure 7 : Les différents récepteurs des prostaglandines

(D'après Breyer *et al*., 2001)

COX-2 permet la biosynthèse de prostaglandines à partir d'AA. Ces prostaglandines agissent de manière autocrine et paracrine pour relayer leurs effets par l'intermédiaire de différents récepteurs. L'expression de ces différents récepteurs dépend du type cellulaire. Les récepteurs IP (I-series prostanoid receptor), DP (D-series prostanoid receptor), EP2, EP4 (E-series prostanoid receptor 2, 3, 4) provoquent une augmentation du taux d'AMPc. Le récepteur EP3 induit une réduction du taux d'AMPc. Les récepteurs TP (T-series prostanoid receptor), EP1 (E-series prostanoid 1 receptor 1) induisent une mobilisation du calcium intracellulaire. Ces récepteurs sont appelés les « récepteurs contractiles ». Les récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) peuvent aussi intervenir (Breyer *et al.* 2001). Les PGI2 sont capables de se lier aux PPARδ (Breyer, Bagdassarian et al. 2001). COX-2 : cyclooxygénase-2; PGG2 : prostaglandine G2 ; PGH2 : prostaglandine H2 ; PGF2α : prostaglandine F2α ; prostaglandine D2 ; PGJ2 : prostaglandine J2 ; PGE2 : prostaglandine E2 ; PGI2 : prostaglandine I2.

Les COX sont des enzymes bi-fonctionnelles capables de convertir dans un premier temps l'AA en endoperoxyde cyclique par sa fonction cyclooxygénase (ou bis-dioxygénase) puis de former à partir de ce produit de la PGH2 (prostaglandine H2) par la fonction peroxydase de l'enzyme (Chandrasekharan *et al.* 2004) (Figure 6). Puis des isomérases présentes en fonction du type cellulaire permettent la synthèse de prostanoïdes, c'est à dire une classe d'eicosanoïdes (molécules lipidiques à vingt atomes de carbones) comprenant les prostaglandines, les thromboxanes et les prostacyclines.

Les prostaglandines sont des molécules impliquées dans la fièvre (PGE2), la douleur, l'inflammation, la régulation de la pression artérielle, l'agrégation plaquettaire (PGI2) (Chandrasekharan and Simmons 2004) et jouent aussi un rôle dans la vasodilatation (PGD2, PGE2, PGI2), la protection de la muqueuse gastrique (PGI2), la coagulation sanguine (*par exemple*, l'action anticoagulante de la PGI2) (Sarkar *et al.* 2007). Des études ont aussi révélé que la PGE2 induit aussi une contraction rythmique du myomètre utérin et favorise l'accouchement (Maslow *et al.* 2004). L'ovulation est aussi accompagnée d'une augmentation de la synthèse de prostaglandines, ce qui suggère une importance de ces molécules dans ce processus (Dubois *et al.* 1998).

Les thromboxanes A2 (TxA2) sont impliquées dans l'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction. Les COXs sont donc des régulateurs puissants de la coagulation sanguine (Dubois, Abramson et al. 1998). Les prostanoïdes synthétisés agissent localement en raison de leur faible stabilité d'une manière autocrine et paracrine (Narumiya *et al.* 2001).

Les prostaglandines et les TxA2 agissent *via* plusieurs types de récepteurs pour transmettre leurs effets (Figure 7). Des récepteurs couplés à des protéines G ont été identifiés, comme les récepteurs des prostaglandines D (DP), des prostaglandines E (EP), des prostaglandines F (FP), des prostaglandines I (IP) et des tromboxanes (TP) (Breyer, Bagdassarian et al. 2001). Ces récepteurs peuvent transmettre leurs effets *via* une augmentation de la concentration d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui conduit à l'activation de plusieurs kinases importantes dans la prolifération ou la survie cellulaire (*par exemple*, les protéines kinases A, PKA). C'est le cas des récepteurs IP, DP, EP2, EP4. Le récepteur EP3 induit au contraire une réduction du taux d'AMPc et mêne donc à une inhibition de PKA ou PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) (Breyer, Bagdassarian et al. 2001). Les récepteurs TP, FP et EP1 induisent une mobilisation du calcium intracellulaire (Harris, Padilla et al. 2002). Certaines prostaglandines peuvent avoir des propriétés anti-inflammatoires. La PGJ2 est un ligand du récepteur nucléaire activé par les proliférateurs de peroxysomes (peroxisome proliferator-activated receptor delta, PPARδ) (Breyer,

Bagdassarian et al. 2001), qui conduit à une inhibition de la production de TNFα induite par le LPS (Ding *et al.* 2006) et donc à une inhibition de l'inflammation. Par ailleurs, le 15-désoxy-Δ 12, 14 - PGJ2, un métabolite de la PGJ2, est capable de se lier au facteur de transcription PPARγ (Breyer, Bagdassarian et al. 2001). Or, il a été démontré que PPARγ régule l'inflammation en inhibant la synthèse de cytokines y compris le TNFα ou l'IL1β (Dubuquoy *et al.* 2006).

Il existe aussi un transporteur de prostaglandines de la famille des polypeptides transporteurs d'anions organiques. Ce transporteur est présent dans un nombre restreint de types cellulaires (Breyer, Bagdassarian et al. 2001).

Les COXs sont localisées au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique ainsi que dans l'enveloppe nucléaire (Chandrasekharan and Simmons 2004). Il s'agit d'une famille d'enzymes regroupant trois membres qui sont COX-1, COX-2 et COX-3 qui sont exprimés différemment en fonction des types cellulaires et qui possèdent des fonctions variées (Tableau 1).

1.1.3.1 COX-1

La cyclooxygénase-1 (COX-1) est une glycoprotéine ubiquitaire de 71 kDa codée par un gène localisé sur le chromosome 9 (PTGS1). Comme la plupart des gènes de ménage, le promoteur de COX-1 ne comporte pas de boîte TATA (CAAT) permettant le recrutement des facteurs généraux de la transcription mais contient plusieurs sites d'initiation de la transcription riches en C et G et contenant 21 sites SP-1. COX-1 joue un rôle dans l'homéostasie cellulaire en participant par exemple à la prolifération cellulaire, grâce à la production de prostaglandines (PGE2). L'expression constitutive de COX-1 au niveau de l'épithélium gastrique conduit à la synthèse de PGE2 qui stimule la prolifération des cellules épithéliales et donc le renouvellement de l'épithélium gastrique (Takeuchi 2010) et de plus stimule la production de mucus et diminue la production d'acide chlorhydrique, ce qui permet de protéger la paroi de l'estomac de l'acidité (Takeuchi). Le métabolisme de l'AA par COX-1 et la TxA2 synthase dans les plaquettes conduit à la production de TxA2, qui joue un rôle important dans la régulation de la coagulation sanguine et de la pression artérielle (Chandrasekharan and Simmons 2004). Par ailleurs, il a été suggéré que COX-1 participe à l'inflammation induite par les plaques β-amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer (Choi *et al.* 2009).

D'un point de vue structural, COX-1 est composée d'un domaine EGF (epithelium growth factor) -like formé de deux doubles feuillets β, d'un domaine de liaison à la membrane du réticulum endoplasmique, composé de quatre hélices α dans lequel se place l'AA (et les AINS) et d'un domaine catalytique bi-fonctionnel avec des structures *alpha*-hélicoïdales et un motif de liaison de l'hème. Le site actif de l'enzyme est composé d'acides aminés essentiels nécessaires à la fixation des ligands et à l'activité catalytique de l'enzyme comme la tyrosine 384 qui est importante pour la formation d'un radical tyrosyle qui amorce la réaction cyclooxygénase de l'enzyme (Howe 2007).

1.1.3.2 COX-2

COX-2 présente 60 % d'homologie avec COX-1 et est inductible. Plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL-1β, l'IL-6 (Hinz *et al.* 2002), ainsi que des facteurs de croissance, des agents pathogènes (*par exemple,* le LPS) sont capables d'induire l'expression de COX-2. Le gène de COX-2 est localisé sur le chromosome 1 (gène PTGS2) et présente un élément de réponse NF-κB dans son promoteur (Chandrasekharan and Simmons 2004) ainsi que d'autres éléments de réponse dépendant de cytokines comme l'IL-6. La protéine COX-2 présente les mêmes domaines que COX-1 (Chandrasekharan and Simmons 2004). L'isoforme COX-2 diffère par une extension du côté carboxy-terminal (C-term) et par un site de liaison aux AINS plus important (Kurumbail *et al.* 1996). Cette caractéristique permet la reconnaissance par les inhibiteurs spécifiques de COX-2 (*par exemple,* le célécoxib, le rofécoxib, le nimésulide). COX-2 est exprimée dans les cellules liées à l'inflammation comme les monocytes ou les fibroblastes mais aussi dans les cellules endothéliales où son expression est stimulée continuellement par le stress de cisaillement induit par la circulation sanguine (White *et al.* 2002; Antman *et al.* 2005 ; Marnett 2009). COX-2 est aussi continuellement exprimé dans le cœur et dans les ovaires où l'enzyme jouerait un rôle dans l'ovulation (Thill *et al.* 2009; Jesam *et al.* 2010).

L'expression de COX-2 est régulée à différents niveaux. D'abord COX-2 est régulée au niveau transcriptionnel (Figure 8) grâce à des facteurs de croissance comme le TGF-α (transforming growth factor alpha) par exemple ou encore l'EGF (epithelial growth factor) mais aussi des cytokines pro-inflammatoires (*par exemple,* l'IL-1β, le TNFα), le LPS (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006)**.** Concernant les cytokines pro-inflammatoires, les voies

de signalisation intracellulaires concernées impliquent souvent l'AMPc et l'activation de CREB (cAMP response element binding) sous la dépendance des PKAs. Pour le TNFα, l'activation de COX-2 dépend de ERK (extracellular signal-regulated kinase) et du facteur de transcription NF-κB (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006). L'expression de COX-2 est aussi induite par les céramides (famille de lipides composée de sphingosine et d'un acide gras) *via* une activation du facteur NF-κB. Par ailleurs, COX-2 est aussi positivement régulée par la voie Wnt/βcat et les voies de signalisation induites par les TLR (toll like receptors). Par ailleurs, des études ont révélé que les UVB (ultratviolets B) activent l'expression de COX-2 dans des cellules cancéreuses en induisant la kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006). Le stress de cisaillement provoqué par la circulation sanguine est responsable d'une induction de l'expression de COX-2 dans les cellules endothéliales (Antman, DeMets et al. 2005). L'expression constante de COX-2 permet la synthèse de PGI2, qui empêche l'agrégation plaquettaire et qui a d'autre part un effet vasodilatateur, favorisant ainsi la circulation sanguine. L'effet des PGI2 est équilibré par l'action des plaquettes, où l'expression constitutive de COX-1 permet la synthèse de TxA2, permettant une vasoconstriction (Wong *et al.* 2010) et stimulant la coagulation (Steffel *et al.* 2006).

COX-2 est également régulée de manière post-transcriptionnelle (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006) par une régulation de la stabilité de l'ARNm de COX-2. En effet, l'ARNm de COX-2 contient un élément ARE (AU-rich element) au niveau de la région 3'NT (non traduite) de son ARNm. Il s'agit d'une région qui est la cible de protéines de la famille AUBP (AU-binding proteins) qui comprennent des protéines qui régulent la stabilité de l'ARNm cible mais aussi sa traduction en protéine (Audic *et al.* 2004). Pour COX-2, la protéine HuR (human antigen R) se fixe sur cet élément pour augmenter la stabilité de l'ARNm (Cerella *et al.* 2010). La demi-vie de l'ARNm est ainsi augmentée. La protéine TTP (tristetraproline), quant à elle, conduit à une dégradation rapide de l'ARNm de COX-2 (Young *et al.* 2009).

De plus, l'ARNm de COX-2 peut être la cible de microARNs (miRs), de petits ARN non-codants d'environ 22 nucléotides qui se fixent de manière complémentaire à l'ARN cible et qui régulent leur stabilité et leur traduction. Pour l'ARNm de COX-2, plusieurs miRs ont été décrits. miR-101 par exemple diminue la traduction de l'ARNm de COX-2 dans des lignées cellulaires de cancer du côlon (Strillacci *et al.* 2009). Par ailleurs, miR-26b joue un

rôle similaire dans des carcinomes du nasopharynx (cellules CNE). En effet, la transfection de ces cellules avec miR-26b conduit à une diminution de l'expression de COX-2. L'étude a aussi révélé que le site ciblé se trouve dans la région 3'NT de l'ARNm de COX-2 (Ji *et al.*).

Finalement, COX-2 est régulée de manière post-traductionnelle. La protéine COX-2 possède 4 sites de N-glycosylation (Nemeth *et al.* 2001). Au niveau de l'asparagine 594 (Asn594) sur une séquence de 19 acides aminés de la région C-term, la glycosylation joue un rôle important dans la dégradation de la protéine par le protéasome 26S (Mbonye *et al.* 2006 ; Mbonye *et al.* 2009). Une étude a ainsi montré que des mutations dans cette séquence inhibent la N-glycosylation de l'asparagine 594 et la dégradation de COX-2 *via* le protéasome 26S (Mbonye, Wada et al. 2006). A l'inverse, l'insertion de la séquence au niveau de la région C-term de COX-1 conduit à sa dégradation. Le processus par lequel des N-glycoprotéines sont retirées du réticulum endoplasmique pour leur dégradation par le protéasome s'appelle « ERAD » (endoplasmic reticulum-associated degradation). La N-glycosylation en Asn594 de COX-2 est importante pour l'initiation de sa dégradation par ce système.

Il existe également une voie d'inactivation suicide de l'activité de COX-2 pendant la catalyse enzymatique (Spencer *et al.* 1999; Smith *et al.* 2000). Ce mécanisme nécessite la formation de radicaux tyrosyles au cours des activités cyclooxygénase et peroxydase de l'enzyme. L'inactivation de l'enzyme est accompagnée de changements de la structure du site catalytique des COXs avec une meilleure exposition des résidus histidines. L'hypothèse émanant de cette découverte a été qu'un tel changement de conformation pourrait sensibiliser COX-2 afin de permettre sa dégradation par le système ERAD. Cependant ce lien n'a pas encore été démontré.

Par ailleurs, une deuxième voie de dégradation de COX-2 a été récemment identifiée. Cette voie est actuellement peu connue mais semble indépendante de la dégradation par le protéasome 26S ou les lysosomes et semble succéder à l'inactivation suicide de COX-2 (Mbonye *et al.* 2008). Ce mode de dégradation a été identifié grâce aux inhibiteurs de COX-2 dans des fibroblastes (NIH/3T3). En effet, la dégradation de COX-2 est retardée par ces inhibiteurs (aspirine, flurbiprofène, NS-398) (Mbonye and Song 2009) suggérant ainsi qu'un site catalytique fonctionnel est nécessaire pour initier ce type de dégradation. Ces données ont été renforcées par le fait que l'administration exogène d'AA dans les cellules HEK293 (cellules rénales embryonnaires humaines), qui n'expriment pas la phospholipase A2 conduit à une dégradation rapide de COX-2 (Reddy *et al.* 1994).

Tableau 1 : Caractéristiques des membres de la famille cyclooxygénase.

(D'après Chandrasekharan et al, 2004)

Ce tableau récapitule les principales caractéristiques des trois membres de la famille COX, comme la localisation du gène, le mode d'expression, le poids moléculaire de la protéine ainsi que sa localisation intracellulaire et sa fonction.

	COX-1	**COX-2**	**COX-3**
Nom du gène	**PTGS1**	**PTGS2**	**PTGS1**
Localisation du gène	**Chr.9**	**Chr.1**	**Chr.9**
Expression	**constitutive**	**inductible**	**constitutive**
Poids moléculaire de la protéine	**71kDa**	**72kDa**	**65kDa**
Localisation intracellulaire	**Membrane, Réticulum endoplasmique**	**Réticulum endoplasmique, membrane, cytoplasme**	**Membrane, Réticulum endoplasmique**
Expression tissulaire	**Ubiquitaire**	**Monocytes, macrophages, cellules tumorales, fibroblastes, cellules endothéliales** **Expression constitutive dans le cœur, les ovaires et l'utérus**	**cerveau**
Fonction physiologique	**Maintien des fonctions homéostatiques** **Neuroinflammation**	**Inflammation, fièvre et douleur** **Ovulation, accouchement** **Maintien des fonctions homéostatiques (pression artérielle, coagulation)**	**Fièvre, douleur**

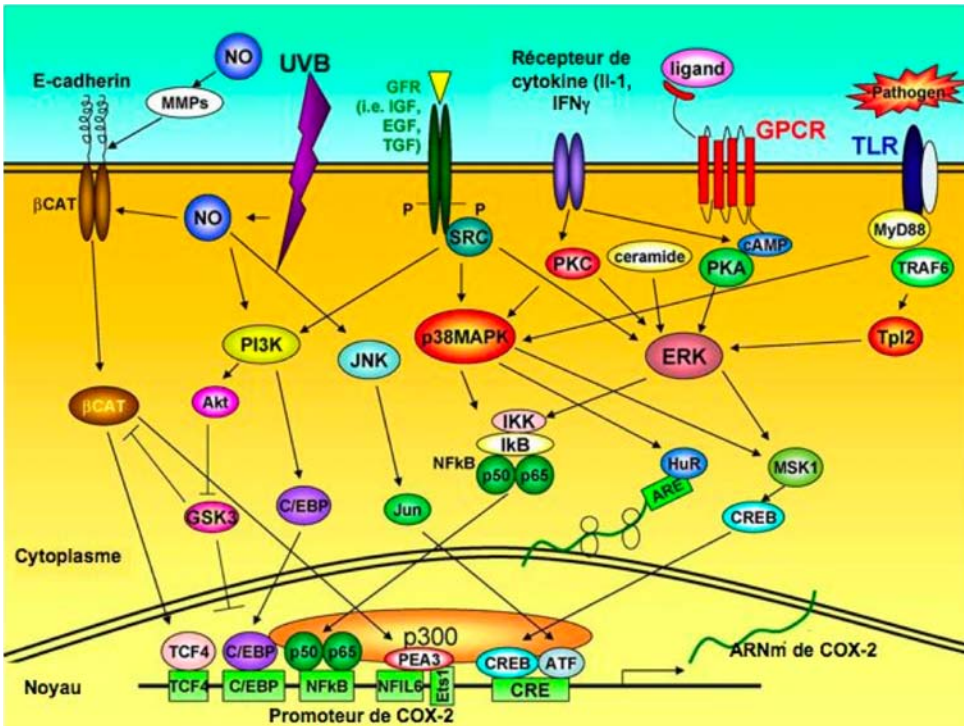


Figure 8 : Voies de signalisation régulant l'expression de COX-2

(D'après Tsatsanis et al., 2006, avec modifications)

L'expression de COX-2 est régulée au niveau transcriptionnel par différentes voies de signalisation mettant en jeu des facteurs de croissance, des cytokines, des agents pathogènes, les UVB. La figure représente quelques exemples de voies de signalisation impliquées dans l'expression de COX-2. COX-2 est aussi régulée de manière post-transcriptionnelle. La protéine HuR influence la stabilité de l'ARNm de COX-2 (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006). βcat : β caténine ; TLR : toll like receptor ; p38 MAPK : p38 mitogen activated protein kinase ; cAMP : cyclic adenosin monophosphate ; JNK : c-jun N-terminal kinase ; PI3K : phosphatidyl inositol 3 kinase ; GPCR : G protein-coupled receptor ; NFκB : nuclear factor κ B ; GFR : growth factor receptor ; NO : nitric oxide ; PKA : protein kinase A ; PKC : protein kinase C ; ARE : AU-rich element ; EGF : epithelial growth factor ; IGF : insulin growth factor ; TGF : transforming growth factor ; MMP : matrix metalloproteinase ; CRE : C AMP responsive element ; CREB : C AMP responsive element binding ; C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein ; IKK : IκB kinase ; IκB : inhibiteur de κ B ; TRAF 6 : TNF receptor associated factor 6 ; IFN : interferon ; Il : interleukin ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; NFIl-6 : nuclear factor for Il-6 ; MyD88 : myeloid differentiation primary response gene ; Src : Sarcoma tyrosine kinase.

Dans ce modèle, il a été aussi montré que l'administration d'AA conduit à une inactivation du site catalytique (Mbonye, Yuan et al. 2008). Le mécanisme passerait donc par un changement de conformation inhibant le site catalytique de COX-2 puis à la dégradation de la protéine indépendamment du protéasome 26S.

L'activité enzymatique de COX-2 peut aussi être régulée. Le monoxyde d'azote, une molécule abondamment produite pendant l'inflammation et ayant une forte affinité pour l'hème de COX-2, stimule son activité catalytique (*S*-nitrosylation) (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006). L'activité de COX-2 peut aussi être régulée par phosphorylation. En effet, dans des cellules endothéliales de neuroblastomes, il a été démontré que la phosphorylation de COX-2 au niveau de résidus tyrosine conduit à une augmentation de son activité catalytique (Parfenova *et al.* 1998).

Plusieurs études ont montré que l'expression de COX-2 est aussi régulée par des mécanismes épigénétiques (Ma *et al.* 2004). Les modifications épigénétiques sont des modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes sans modification du code génétique. Il s'agit de modifications de l'ADN comme la méthylation des îlots CpG (cytosine-phosphodiester bond-guanine), des régions situées dans les promoteurs de nombreux gènes et constituées de dimères C-G (cytosine-guanine) mais aussi des modifications des protéines permettant la compaction de l'ADN dans le noyau, comme les histones (composant les nucléosomes) (Jaenisch *et al.* 2003). La méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG est un mécanisme qui permet l'extinction de l'expression d'un gène (Jaenisch and Bird 2003). Par ailleurs, les histones peuvent subir différentes modifications comme des acétylations qui sont responsables d'une décondensation de l'ADN. L'accès des facteurs de transcription à leurs gènes cibles est alors facilité. Par contre, les désacétylations des histones vont provoquer une compaction de l'ADN au niveau des histones modifiés, diminuant ainsi l'accès des facteurs de transcription aux gènes (Jaenisch and Bird 2003). Il existe d'autres types de modifications des histones. Ce sont par exemple les méthylations sur des résidus lysines qui sont responsables d'une inhibition de la transcription. Les mécanismes épigénétiques sont sous la dépendance d'enzymes spécifiques. Ainsi la méthylation des îlots CpG est assurée par des enzymes capables de transmettre un groupement méthyle, appelées DNMT (DNA methyl-transférase). Pour les acétylations/désacetylations des histones, ce sont les HAT (histone acetyl-transférase), les HDACs (histone deacetylase) qui vont intervenir.

Une étude où des cellules tumorales de cancers du sein exprimant COX-2 (lignées cellulaires 66.1, 410.4, 168) et n'exprimant pas COX-2 (lignée cellulaire 410) ont été greffées à des souris syngéniques, a révélé que l'expression de COX-2 est corrélée au niveau de la

méthylation du promoteur de COX-2 puisque les tumeurs dérivées des cellules tumorales négatives pour COX-2 présentent une méthylation aberrante du promoteur (Ma, Yang et al. 2004). L'expression de COX-2 peut être restaurée par traitement des cellules avec la 5-Aza-désoxycytidine, un agent déméthylant. L'expression de COX-2 est corrélée à un potentiel métastatique plus important dans cette étude. Ces données suggèrent que le promoteur de COX-2 est déméthylé pendant la progression tumorale. Des méthylations aberrantes du promoteur de COX-2 au niveau des îlots CpG ont été observées dans d'autres types de cancers comme le cancer du côlon par exemple (Toyota *et al.* 2000).

1.1.3.3 COX-3

COX-3 a été décrite pour la première fois dans des tissus canins (Kis *et al.* 2003). La protéine est codée par le gène COX-1 (PTGS1). La différence entre COX-1 et COX-3 réside dans le fait que l'intron 1 de l'ARNm de COX-3 n'est pas épissé (Chandrasekharan *et al.* 2002). COX-3 est surtout exprimée dans le cerveau, le coeur et la moelle épinière (Kis, Snipes et al. 2003; Chandrasekharan and Simmons 2004; Sarkar, Adsule et al. 2007). Actuellement, le rôle de COX-3 n'est pas encore défini mais il a été suggéré que l'acétaminophène (paracétamol) est un inhibiteur sélectif de COX-3 (Chandrasekharan, Dai et al. 2002), suggérant un rôle de COX-3 dans la sensibilité à la douleur. Cependant, l'hypothèse est controversée puisque d'autres études ont décrit une capacité de ce composé à inhiber COX-2 (Hinz *et al.* 2008), rendant ainsi l'élucidation du rôle de COX-3 difficile.

1.1.4 COX-2 et cancer

L'utilisation des AINS, des substances inhibant les COXs et d'inhibiteurs spécifiques de COX-2 *(par exemple,* le célécoxib, le rofécoxib) est associée à une diminution de l'incidence de plusieurs maladies dont le cancer, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie d'Alzheimer (Dubois, Abramson et al. 1998 ; Ristimaki 2004). Ce lien est particulièrement bien décrit pour les cancers solides comme le cancer du côlon (Sheng *et al.* 1997 ; Li, Wu et al. 2001) ou le du cancer du sein par exemple où COX-2 est surexprimée (Secchiero *et al.* 2005; Howe 2007).

Une surexpression de COX-2 a pu être observée dans plusieurs types de cancers comme par exemple le cancer colorectal, pancréatique, du poumon. La surexpression de COX-2 est corrélée avec un mauvais pronostic (Dubois, Abramson et al. 1998; Cao *et al.* 2002; Ristimaki *et al.* 2002; Secchiero, Barbarotto et al. 2005). Une surexpression de COX-2 a été aussi observée dans des cancers hématologiques comme par exemple dans la lignée cellulaire RAJI (lymphome de Burkitt) ou U937 (leucémie myéloïde aiguë promonocytaire) (Nakanishi *et al.* 2001 ; Wun *et al.* 2004) mais aussi dans des cellules provenant de patients (Wun, McKnight et al. 2004; Secchiero, Barbarotto et al. 2005). Cette surexpression pourrait signifier que COX-2 puisse jouer un rôle très important dans la promotion tumorale en induisant la prolifération des cellules tumorales, en réduisant la mort cellulaire programmée et en diminuant l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses (chimiothérapie, radiothérapie, thérapie photodynamique) (Philip *et al.* 2004; Palayoor *et al.* 2005; Chan *et al.* 2007; Johnson *et al.* 2008; Zrieki *et al.* 2008) mais aussi en induisant l'angiogenèse tumorale et le développement de métastases en inhibant l'anoïkis, c'est-à-dire l'apoptose induite par perte d'adhérence des cellules (Choi *et al.* 2005). L'induction de COX-2 est associée à une forte production de PGE2. Les PGE2 jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire et l'invasion des cellules tumorales. Les PGE2 agissent de manière autocrine et paracrine par des récepteurs (EP1, EP2, EP3, EP4) à sept domaines transmembranaires de type rhodopsine, couplés à une protéine G. Ces récepteurs sont associés à des voies de signalisation différentes. Ainsi, le récepteur EP1 agit en activant la voie phospholipase C (PLC)/inositol triphosphate (IP3), conduisant à une mobilisation intracellulaire du calcium. Les récepteurs EP2 et EP4 sont couplés à des protéines G stimulatrices qui activent l'adénylate cyclase, conduisant ainsi à une augmentation du taux d'AMPc qui à son tour active plusieurs voies de signalisation responsables d'une augmentation de la prolifération cellulaire (Grossmann 2002). Le récepteur EP3 est couplé à une protéine G inhibitrice (Gi). L'activation de ce récepteur conduit à une inhibition de l'adénylate cyclase et donc à une diminution du taux d'AMPc intracellulaire (Breyer, Bagdassarian et al. 2001). L'expression différentielle de ces récepteurs en fonction du type cellulaire explique les effets divers et antagonistes de la PGE2 déjà décrits dans la littérature.

Le lien entre COX-2 et cancer est surtout décrit dans le cas des tumeurs adhérentes mais est actuellement peu connu dans le cas des cancers hématologiques comme les leucémies et les lymphomes. Pour le cancer colorectal, il a été démontré que la PGE2 est la prostaglandine la plus produite durant la cancérogenèse (Boughton-Smith *et al.* 1983). Par ailleurs, le taux de prostaglandines est corrélé à la taille de la tumeur lors d'une polypose

adénomateuse familiale (Yang *et al.* 1998), suggérant ainsi un lien entre la croissance tumorale et la production de PGE2. D'autre part, la PGE2 possède une capacité à inhiber l'apoptose des cellules tumorales du cancer du côlon. Il a été ainsi publié que la PGE2 peut induire l'expression de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, dans les cellules d'adénocarcinome HCA-7 (Sheng *et al.* 1998). Dans cette même étude, une modulation des MAPKs précédant l'augmentation de Bcl-2 a été décrite (Sheng, Shao et al. 1998). La capacité des PGE2 à moduler la progression tumorale a également été documentée dans d'autres modèles comme les cellules humaines HT-29 de cancer du côlon. Dans ce type cellulaire, les PGE2, *via* les récepteurs de type EP4, augmentent le taux intracellulaire d'AMPc (Doherty *et al.* 2009). Les PGE2 sont par ailleurs capables de transactiver le récepteur de l'EGF (EGFR : epithelial growth factor receptor) en provoquant la libération d'amphiréguline, un ligand du récepteur de l'EGF (Damstrup *et al.* 1999). L'étude a montré que l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de COX-2, le SC-236, inhibe la prolifération des cellules HT-29 et que cet effet inhibiteur est amplifié en le combinant avec un anticorps neutralisant l'amphiréguline (Doherty, Byrne et al. 2009). La transduction de l'EGFR par les PGE2 peut conduire à l'activation d'autres kinases comme Akt, une kinase importante pour la survie cellulaire (She *et al.* 2005). Ce lien a notamment été publié dans une étude de Tessner *et al* dans laquelle les cellules HCT-116 traitées par de la 16,16 diméthyl PGE2 (dmPGE2) résistent à l'apoptose induite par des radiations. Cet effet est lié à la phosphorylation de PKB (protéine kinase B) consécutive à l'activation des récepteurs EP2 par les dmPGE2 (Tessner *et al.* 2004). L'activation de PKB inhibe l'activation de Bad (Bcl-2-associated death), la translocation à la mitochondrie nécessaire à l'activation de Bax (Bcl-2-associated X protein), une protéine pro-apoptotique (Burlacu 2003). La PGE2 peut aussi activer la kinase Src (sarcoma kinase) comme l'a montré une étude de Yamaki *et al* (2004) (Yamaki *et al.* 2004) sur des cellules A549 qui expriment le récepteur EP3. L'activation de Src conduit à l'activation de STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), un facteur de transcription qui régule l'expression de la cycline D1, une protéine importante pour le déroulement du cycle cellulaire, notamment lors de la transition G1/S du cycle cellulaire Par ailleurs, STAT3 a un effet anti-apoptotique en transactivant l'expression de Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large), une protéine anti-apoptotique (Billen *et al.* 2008).

Le cancer du poumon à petites cellules est souvent associé à une mutation de Ras, une petite protéine G, essentielle à la voie des MAPKs. Cette mutation est corrélée à un pronostic défavorable (Bos 1989) et conduit alors à une induction de l'expression de COX-2 et ainsi à une forte production de PGE2 (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006). La PGE2

favorise la prolifération de ces cellules tumorales comme il l'a été publié pour la lignée cellulaire A549 d'adénocarcinome du poumon par activation de la voie Ras (Yano *et al.* 2002). La voie des MAPKs est impliquée dans la prolifération cellulaire en activant plusieurs oncogènes comme c-Myc par exemple (Junttila *et al.* 2008).

Plusieurs études ont montré que les PGE2 jouent un rôle dans l'invasion tumorale. En effet, une étude de Ma *et al* a montré que les PGE2 induisent la formation de métastases (Ma *et al.* 2006). Une autre étude a montré que la PGE2 mène à la synthèse de VEGF (vascular endothelial growth factor), un important promoteur de l'angiogenèse (Majima *et al.* 2000).

Toutes ces études suggèrent que COX-2, de par son effet promoteur de tumeurs, est une bonne cible en thérapie anti-cancéreuse. L'effet pro-tumoral des PGE2 dépend du type cellulaire et du niveau d'expression des différents récepteurs. Les voies de signalisation impliquant les récepteurs EP, de même que leurs rôles et leurs mécanismes d'expressions, ne sont pas encore complètement élucidés et restent à être caractérisés avant une éventuelle application clinique.

1.1.5 Les inhibiteurs synthétiques et naturels de COX-2

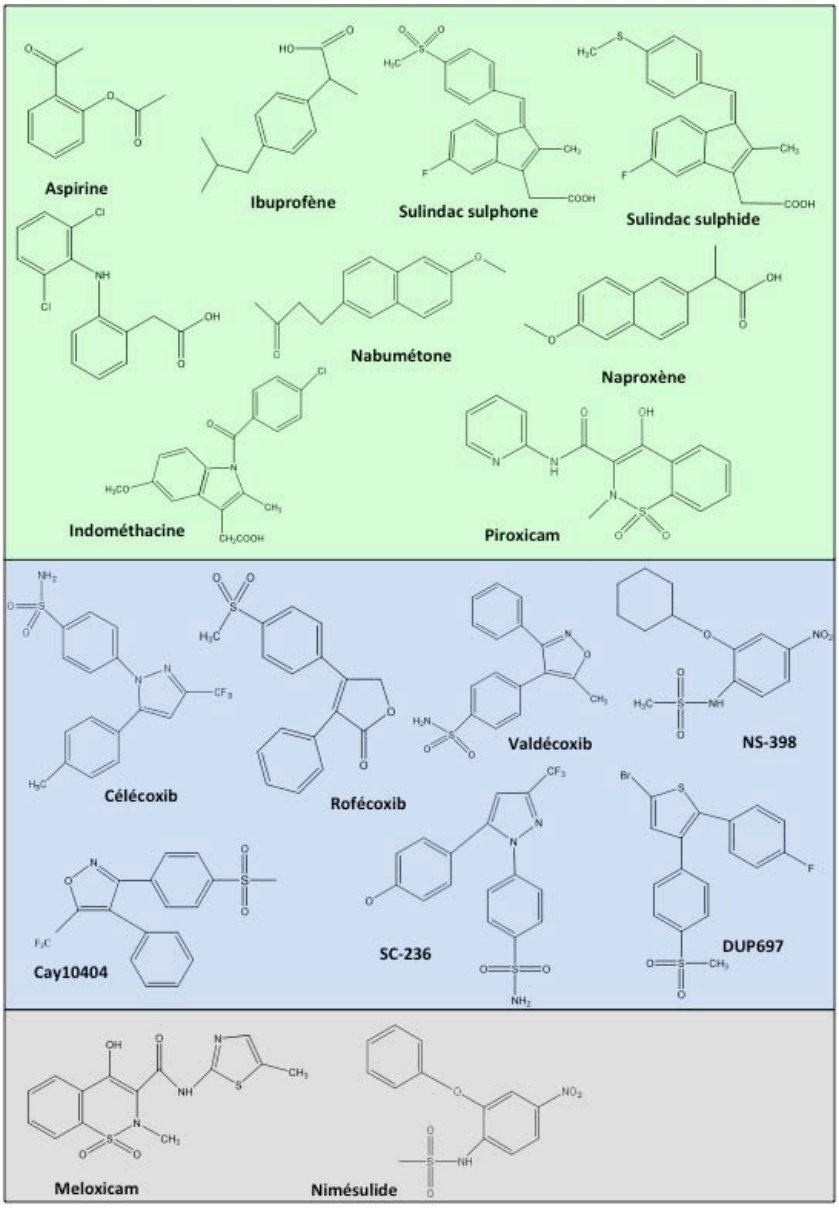
1.1.5.1 Les inhibiteurs synthétiques de COX-2

COX-2 est la cible des AINS (Cao and Prescott 2002) (*par exemple*, l'indomethacine, le flurbiprofène) et d'inhibiteurs spécifiques (*par exemple*, le rofécoxib, le célécoxib, l'étoricoxib). Ces anti-inflammatoires sont pour la plupart des inhibiteurs compétitifs de COX-2. COX-2 présente une extension du côté C-term et un site de liaison aux AINS plus important (Kurumbail, Stevens et al. 1996) qui permet la reconnaissance spécifique de COX-2 par les inhibiteurs spécifiques (Figure 9). L'un des premiers AINS à avoir été découvert est l'acide acétylsalicylique (aspirine), qui a été isolé en 1829 (Kopp *et al.* 1994; Green 2001). L'aspirine est capable d'acétyler le site actif de COX sur un résidu sérine qui conduit à une inhibition irréversible (Green 2001). Les AINS (ibuprofène, aspirine, ketoprofène) (Tableau 2) sont capables d'inhiber COX-2 mais ces substances sont aussi capables d'inhiber COX-1 (Green 2001) et génèrent ainsi des effects secondaires indésirables comme une altération de la muqueuse gastrique. Des problèmes rénaux ont aussi été mis en évidence suite à l'utilisation des AINS qui provoquent une rétention de sodium et la formation d'oedèmes.

Tableau 2 : Classification des inhibiteurs de COXs

(D'après Sobolewski et al., 2010 , avec modifications)

Les inhibiteurs de COX-2 peuvent être séparés en trois catégories. Il y a tout d'abord les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques (en vert) qui sont capables d'inhiber l'activité de COX-1 et de COX-2. Puis, il y a les inhibiteurs spécifiques de COX-2, qui n'inhibent que l'activité de COX-2 (en bleu). Enfin, il y a le nimésulide et le méloxicam qui sont souvent désignés comme inhibiteurs préférentiels de COX-2 (en gris) en raison de leur capacité à inhiber COX-1 mais que pour les plus fortes posologies recommandées.



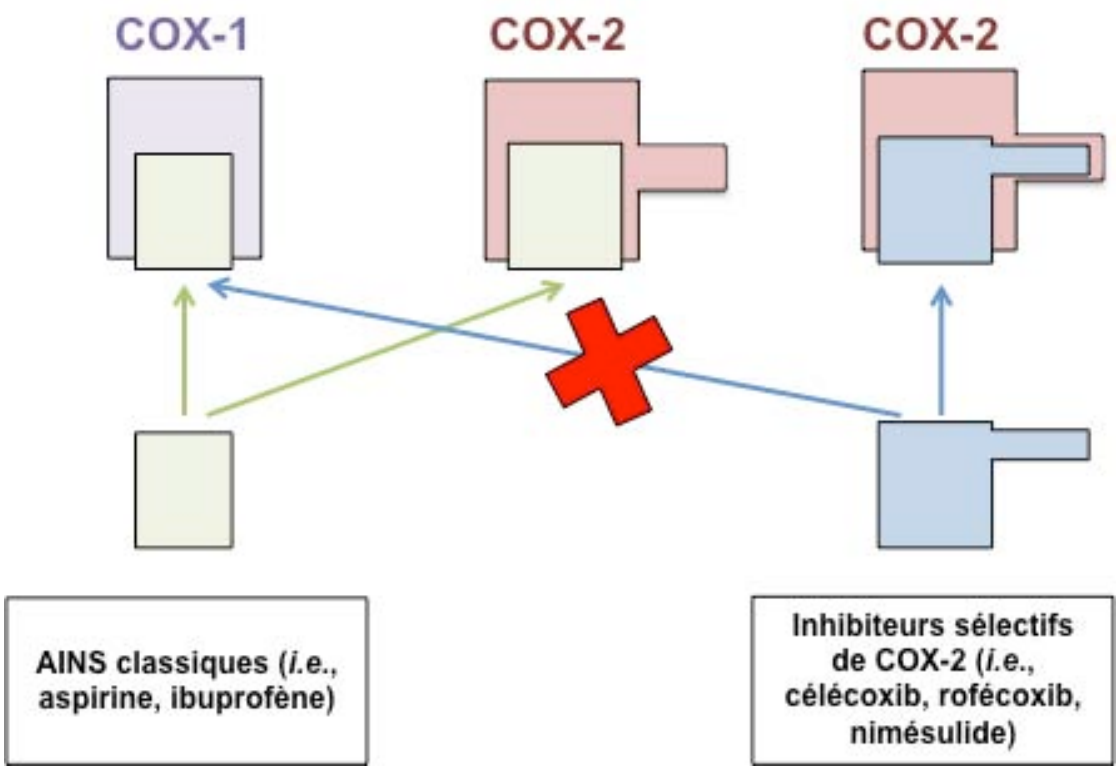


Figure 9 : Mode d'action des AINS

(D'après Kurumbail *et al*, 1996, avec modifications)

L'enzyme COX-2 présente une extension supplémentaire par rapport à COX-1 du côté C-term qui est responsable de la spécificité des inhibiteurs spécifiques de COX-2 (*par exemple*, le célécoxib ou le rofécoxib). L'extension C-term existe pour COX-1, mais elle ne permet pas la fixation des inhibiteurs spécifiques de COX-2 car elle n'est pas accessible. Cette « poche » est accessible aux inhibiteurs spécifiques de COX-2 en raison d'une substitution d'une isoleucine par une valine en position 523. Les AINS classiques (*par exemple*, l'ibuprofène ou le kétoprofène) ont la capacité de se fixer sur les deux isoformes de COX. L'inhibition de COX-1 s'accompagne d'effets délétères : ulcères, problèmes cardiovasculaires.

Par ailleurs, les inhibiteurs de COX-2 diminuent la filtration glomérulaire et provoquent une hypertension (Antman, DeMets et al. 2005). Des études ont finalement mis en évidence un risque d'insuffisance cardiaque suite à la prise d'AINS classiques (Hudson *et al.* 2007). D'autres anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont plus spécifiques de COX-2 comme le nimésulide par exemple.

Comme l'inhibition de COX-1 par des AINS était responsable de nombreux effets secondaires, des études ont été menées pour trouver d'autres substances n'ayant que la capacité d'inhiber COX-2. Ainsi, d'autres anti-inflammatoires non-stéroïdiens de la classe des « Coxibs » ayant cette capacité ont été mis sur le marché en 1999 (célécoxib et rofécoxib) (Tableau 2). Cependant des effets secondaires de cette famille de médicament ont été décrits y compris les complications cardiovasculaires associées à un usage chronique (Hudson, Rahme et al. 2007). Des études ont révélé que ces effets sont causés par l'inhibition sélective de COX-2. En effet, l'expression de COX-2 est stimulée par le stress de cisaillement imposé par la circulation sanguine au niveau des cellules endothéliales. L'induction de COX-2 conduit dans les cellules à une production de PGI2 ayant un pouvoir anticoagulant et vasodilatateur. Ces effets permettent de contre-balancer la production de TxA2 par les plaquettes et ainsi favorisent la circulation sanguine (Antman, DeMets et al. 2005). L'inhibition complète de COX-2 conduit donc à un déséquilibre de cette balance et ainsi à une dominance de l'effet des plaquettes. L'augmentation du ratio TxA2/PGI2 conduit alors à une agrégation plaquettaire et une vasoconstriction. Par ailleurs, l'inhibition de COX-2 conduit à une accumulation d'AA qui sera alors disponible pour d'autres voies métaboliques. C'est notamment le cas de la lipoxygénase qui convertit l'AA en leucotriènes. Parmi celles-ci, les leucotriènes B4 (LTB4) inhibent la prostacycline synthase (PGI2 synthase), accentuant d'autant plus le déséquilibre TxA2/PGI2 (Marnett 2009). Ainsi, le rofécoxib et le valdécoxib ont été retirés du marché à cause d'un risque accru d'infarctus du myocarde (Grosch *et al.* 2006). Ces effets secondaires suggèrent une attention particulière concernant l'utilisation des autres composés de la même famille et ouvrent la discussion sur les bénéfices de ces molécules comparés à leurs risques. L'utilisation de méthodes alternatives pour inhiber COX-2, comme par exemple l'interférence par l'ARN en utilisant des vecteurs (par exemple, les adénovirus), a été suggérée par Strillacci *et al* (Strillacci *et al.* 2006) et Chan *et al* (Chan, Wong et al. 2007).

D'autres molécules sont aussi capables d'inhiber spécifiquement COX-2. Parmi ces substances se trouvent des molécules utilisées comme outils en recherche comme le SC-558 (Kurumbail, Stevens et al. 1996), DUP-697 (Peng *et al.* 2008), le SC-58125 (Sheng, Shao et al. 1997), le NS-398 (Yao, Lam et al. 2004) par exemple. Pour certains, l'inhibition de COX-

2 est irréversible comme le NS-398 qui induit un changement de conformation de COX-2 (Kurumbail, Stevens et al. 1996).

Des études récentes ont cependant suggéré que les inhibiteurs de COX-2 augmentent les risques d'accidents cardiovasculaires que chez des patients ayant d'autres problèmes comme par exemple de l'hypertension ou encore des problèmes liés au métabolisme lipidique comme par exemple l'athérosclérose (White, Faich et al. 2002). Ces données suggèrent que l'utilisation des inhibiteurs de COX-2 doit être limitée aux patients qui présentent de faibles risques de troubles cardiovasculaires. Une telle population pourrait être identifié à l'aide de biomarqueurs (Chaiamnuay *et al.* 2006). L'une des perspectives facilitant l'utilisation des inhibiteurs de COX-2 serait donc l'identification de ces biomarqueurs afin de définir le risque biologique individuel et de limiter l'utilisation de ces molécules aux personnes appropriées. Une telle approche pourrait avoir des implications thérapeutiques et chimiopréventives importantes, particulièrement pour le cancer du côlon.

Les effets secondaires sont liés à l'inhibition de l'activité enzymatique de COX-2 et/ou de COX-1. Ainsi des analogues d'inhibiteurs de COX-2 n'ayant pas la capacité d'inhiber COX-2 ont été développés. Dans ce sens, le 2,5-dimethyl-célécoxib (DMC), un analogue du célécoxib a été étudié (Dent *et al.* 2005 ; Kardosh *et al.* 2005 ; Schonthal 2006) et ce composé présente des propriétés antitumorales plus importantes que le célécoxib et agit à des concentrations plus faibles (Dent, Yacoub et al. 2005 ; Kardosh, Wang et al. 2005 ; Schonthal 2006).

Il a aussi été suggéré que les antagonistes des récepteurs EP pourraient substituer les inhibiteurs classiques de COX-2. Cet argument est renforcé par des études montrant que les antagonistes des récepteurs EP peuvent diminuer la prolifération cellulaire et l'invasion tumorale dans différents modèles (Amano *et al.* 2003 ; Ma, Kundu et al. 2006; Doherty, Byrne et al. 2009). Une telle stratégie pourrait donc être plus spécifique pour inhiber l'effet des prostaglandines et ainsi limiter les effets secondaires observés avec les AINS.

1.1.5.2 Les inhibiteurs naturels de COX-2

Plus récemment, l'utilisation de produits naturels ayant la capacité d'inhiber l'expression de COX-2 a été suggérée dans plusieurs études (Cerella, Sobolewski et al. 2010). En effet, une étude de Bhui *et al* (Bhui *et al.* 2009) a montré que la bromélaine, un composé

présent dans l'ananas conduit à une inhibition de l'expression de COX-2 *via* une inhibition de la voie NFκB. La curcumine, un polyphénol de *Curcuma longa* ayant des propriétés anti-inflammatoires et antiprolifératives par inhibition de l'expression de COX-2, présente des propriétés antitumorales dans différents modèles cellulaires adhérents comme le cancer du côlon, de la prostate, le cancer cervical mais aussi dans les cancers hématologiques (Singh *et al.* 2009 ; Kelkel *et al.* 2010 ; Teiten *et al.* 2011). Marin *et al* a montré que la curcumine inhibe l'activité de NFκB et ainsi l'expression de ses gènes cibles dont COX-2 et induit l'apoptose des cellules de mélanomes mais pas des mélanocytes normaux (Marin *et al.* 2007). Par ailleurs, la curcumine a montré une capacité à diminuer l'expression de COX-2 sans modifier l'expression de COX-1 (Park *et al.* 2007). L'étude suggère que la curcumine pourrait avoir moins d'effets délétères que les AINS classiques, notamment au niveau du tractus gastro-intestinal. La coumarine (1,2-benzopyrone) est un autre produit naturel que l'on retrouve dans plusieurs plantes et épices. Cette molécule inhibe l'expression de Bcl-xL, de COX-2 et inhibe la voie des MAPKs (Goel *et al.* 2009). D'autres molécules ont montré la capacité d'inhiber l'expression de COX-2. L'apigénine (Xu *et al.* 2008), le DA-6034, un dérivé de l'eupatiline (une flavone O-méthylée) (Nam *et al.* 2008), l'EGCG (épigallocatéchin gallate) du thé vert (Harper *et al.* 2007), la butéine (Pandey *et al.* 2007), le BNO 1455 (un extrait de l'écorce de saule) (Hostanska *et al.* 2007). Il est important de préciser aussi que de nombreux produits naturels peuvent aussi inhiber l'expression de COX-2 *via* une modulation d'événements post-transcriptionnels. C'est par exemple le cas de de l'EGCG qui déstabilise l'ARNm de COX-2 dans un modèle de cancer colorectal (Adhami *et al.* 2007). L'étude a montré que l'EGCG diminue l'expression de la protéine HuR qui est impliquée dans la stabilisation de l'ARNm de COX-2 et qui augmente l'expression du facteur TTP capable de déstabiliser l'ARNm de COX-2 (Adhami, Malik et al. 2007).

Par ailleurs, des études ont suggéré de combiner des produits naturels anti-inflammatoires avec des anti-inflammatoires classiques (AINS ou inhibiteurs spécifiques de COX-2) (Lev-Ari *et al.* 2005; Adhami, Malik et al. 2007). De telles combinaisons pourraient permettre de diminuer les doses d'inhibiteurs classiques et donc de réduire les effets secondaires associés à ces molécules. Dans ce sens, il a été montré que la combinaison de produits naturels avec des anti-inflammatoires classiques pourrait être utilisée en chimioprévention mais aussi en chimiothérapie.

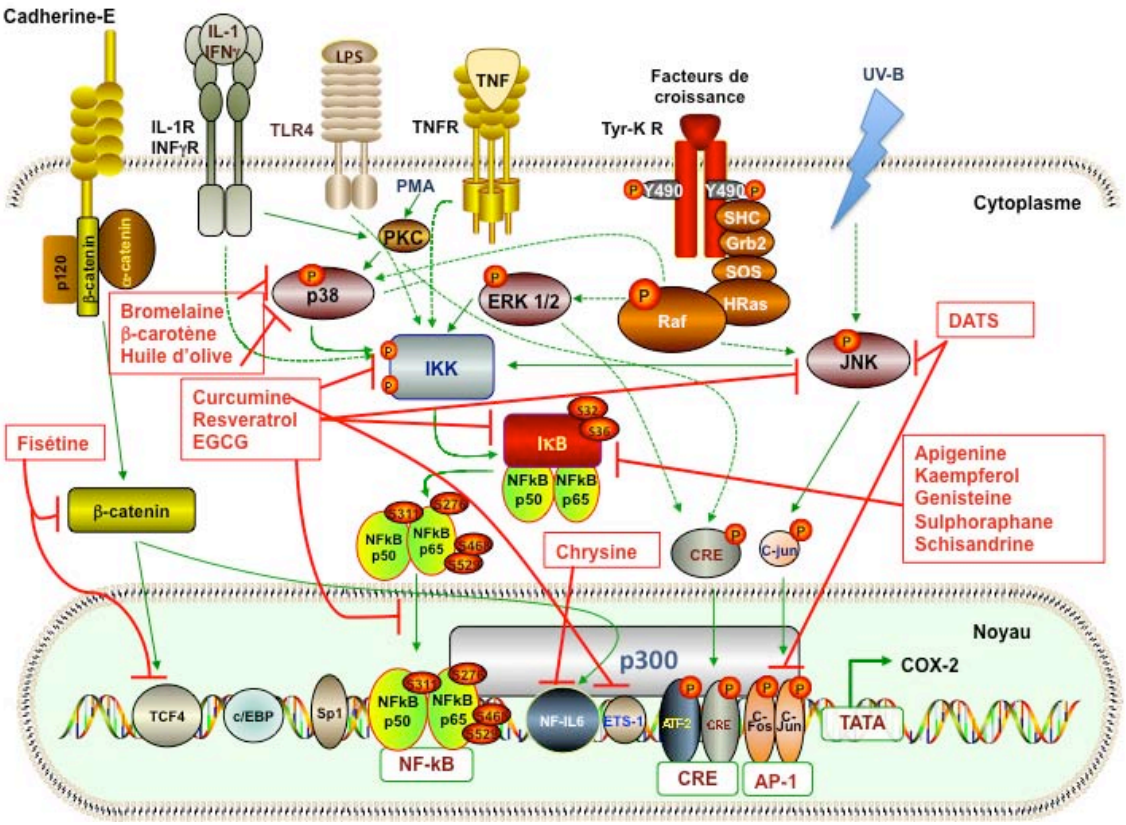


Figure 10 : Les produits naturels qui diminent l'expression de COX-2 au niveau transcriptionnel

(D'après Cerella et al., 2010, avec modifications)

De nombreux produits naturels possèdent une capacité à inhiber l'expression de COX-2 au niveau transcriptionnel. Les modes d'actions de ces composés sont variés et passent par l'inhibition de NFκB, des MAPKs y compris p38MAPK, de JNK et de la voie Wnt/β-caténine.

La combinaison d'inhibiteurs de COX-2 (NS-398) avec des polyphénols du thé vert comme par exemple l'EGCG a généré une diminution de la prolifération cellulaire et une induction d'apoptose plus importante que les deux traitements séparés sur différentes lignées de cancer de la prostate (LNCAP, PC3 et CWR22Rv1) (Adhami, Malik et al. 2007).

Dans cette même étude, des effets similaires ont été reproduits *in vivo* : les cellules CWR22Rv1 ont été injectées à des souris immunodéficientes ayant été traitées par du célécoxib et de l'EGCG (Adhami, Malik et al. 2007). Ces données *in vivo* suggèrent donc que cette stratégie combinatoire possède des propriétés antitumorales pertinentes. La combinaison curcumine/célécoxib a aussi montré un effet anti-prolifératif et apoptotique synergique dans les cellules HT-29, SW-480, Caco-2 (Lev-Ari, Strier et al. 2005).

1.2 Implications de COX-2 dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire

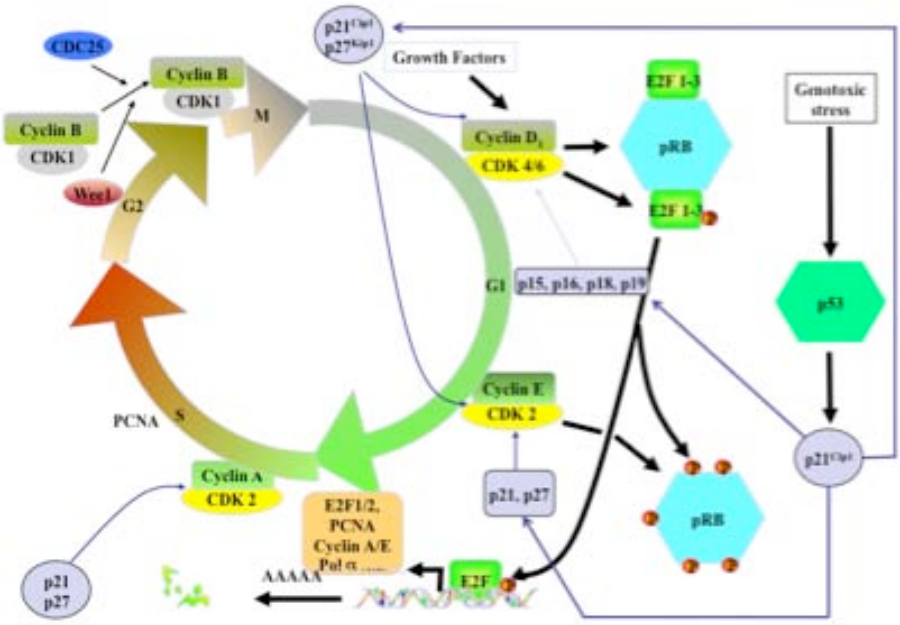
1.2.1 Régulation et surveillance du cycle cellulaire

1.2.1.1 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus séquentiel pendant lequel les cellules somatiques se divisent pour donner deux cellules-filles identiques. Ce cycle est composé de mitoses et de phases inter-mitotiques appelées interphases. L'interphase est constituée de trois étapes successives qui sont G1, S (synthèse), G2 et la mitose (Figure 11). La durée du cycle cellulaire varie selon les cellules et dépend essentiellement de la phase G1. La durée de cette phase est caractéristique du type cellulaire ou de stade de différenciation des cellules. Les cellules cancéreuses possèdent une phase G1 plus courte que les cellules normales, ce qui expliquent en partie pourquoi les cellules tumorales prolifèrent plus rapidement (Massague 2004 ; van den Heuvel 2005 ; Wikman *et al.* 2006). La différenciation cellulaire s'accompagne généralement d'un arrêt du cycle cellulaire avec une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Abelev 2000).

Durant la phase G1, il n'y a pas de synthèse d'ADN. Cependant, il y a synthèse d'ARN dans le noyau et de protéines dans le cytoplasme. La phase S est la phase où l'ADN se réplique et qui permet donc de doubler la quantité d'ADN. Durant cette phase, il y a aussi réparation des éventuelles erreurs de copies de l'ADN. La phase M (mitose) est subdivisée en plusieurs étapes qui sont la prophase, la métaphase, l'anaphase, la télophase et la cytodiérèse. C'est lors de cette étape que la séparation de la cellule-mère en deux cellules-filles s'opère.

A



B

Etapes du cycle cellulaire	Complexes cyclines / Cdk	Fonctions
G1	cycline D/Cdk4 cycline D / Cdk6	Inactivation de la protéine Rb, libération du facteur E2F
G1/S	cycline E / Cdk2	Inactivation de la protéine Rb, libération du facteur E2F
S	cycline A / Cdk2	Phosphorylation des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN
G2/M	cycline B / Cdk1	Déclenchement de la mitose : fragmentation de l'enveloppe nucléaire

Figure 11 : Le cycle cellulaire et les principales cyclines/Cdks impliquées

(D'après Stewart et al, 2003 avec modifications)

Le cycle cellulaire est un mécanisme qui se divise en quatre phases appelées G1, S, G2 et M. Le déroulement de ces 4 phases nécessite l'intervention de différents complexes cycline/Cdks. Ces complexes interviennent dans un ordre précis (**A**). Le rôle des différents complexes cyclines/Cdks est récapitulé dans le tableau en **B**. Une cycline peut se lier à plusieurs Cdks. Cdk : *Cyclin dependent kinase ;* pRb : *Retinoblastoma protein ; E2F : Elongation 2 factor.*

1.2.1.2 Régulation des différentes étapes du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus finement régulé afin d'assurer l'obtention de deux cellules-filles identiques à partir d'une cellule mère. Ce processus fait intervenir des protéines à activité sérine-thréonine kinase connues sous le nom de « Cdk » (cyclin-dependent kinase). Il en existe plusieurs et elles interviennent tout le long du cycle cellulaire selon un ordre précis (Figure 11) (Stewart *et al.* 2003). Ces protéines phosphorylent des substrats qui interviennent dans le déroulement du cycle cellulaire comme la phosphorylation des lamines nucléaires par exemple, permettant la fragmentation du noyau. Les Cdks transfèrent le groupement γ-phosphate de l'ATP (adénosine triphosphate) sur une thréonine ou une sérine de la protéine ciblée. Les Cdks possèdent une structure caractérisée par la présence de deux poches. La première permet la fixation à la protéine cible alors que l'autre poche permet de fixer l'ATP. Ces protéines sont régulées par phosphorylation et déphosphorylation. Les Cdks sont activées par des phosphatases comme les CDC25 (cell division cycle 25 homolog) comme CD25C pour Cdk1 par exemple, mais aussi des kinases (*par exemple,* la CAK: Cdk activating kinase, cycline H/Cdk7). Les Cdks sont inhibées par des kinases (*par exemple,* Wee1 pour Cdk1) (Stewart, Westfall et al. 2003).

D'autre part, les Cdks sont régulées par des protéines chaperonnes appelées « cyclines » (Figure 11). La fixation de la cycline sur la Cdk provoque un changement de conformation de la Cdk qui libère son site catalytique. Les complexes cyclines/Cdks jouent un rôle dans les événements du cycle cellulaire comme la fragmentation de l'enveloppe nucléaire, la condensation des chromosomes, la réplication de l'ADN ou encore le réarrangement du cytosquelette (*par exemple,* cycline B/Cdk1) (Stewart, Westfall et al. 2003).

1.2.2 La progression du cycle cellulaire

1.2.2.1 Les protéines de la famille Myc et la régulation de la transition G1/S

La plupart des cellules d'un organisme sont en quiescence (ou phase G0), c'est-à-dire qu'elle sont hors du cycle cellulaire. L'entrée en mitose de ces cellules nécessite une stimulation par des facteurs mitogènes comme les facteurs de croissance ou d'autres stimuli extracellulaires (*par exemple,* des cytokines pro-inflammatoires). Ces signaux extracellulaires

sont responsables de l'activation de voies de signalisation intracellulaires (*par exemple,* mitogen activated protein kinases) qui conduisent à la transcription de gènes requises par la cellule pour entrer en phase G1 du cycle cellulaire. Plusieurs oncogènes jouent ici un rôle clé afin de permettre l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire. Il s'agit notamment des protéines c-fos, c-jun ou encore des protéines de la famille Myc.

La famille Myc comprend plusieurs membres, dont c-Myc qui est surexprimé dans différents types d'hémopathies (*par exemple,* le lymphome de Burkitt) (Junttila and Westermarck 2008), N-Myc présent notamment dans les cellules neuronales (Gualdrini *et al.* 2010), L-Myc qui a été identifié dans des cellules humaines de carcinome du poumon (Zajac-Kaye 2001). La mutation des protéines de la famille Myc est fréquemment associée à un blocage des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire.

Il s'agit d'un facteur de transcription possédant un domaine hélice-boucle-hélice et un motif leucine zipper qui s'hétérodimérise avec la protéine Max afin de se fixer sur son élément de réponse appelé « boîte E » au niveau de ses gènes cibles (Hurlin *et al.* 2004). L'expression de c-Myc est fortement diminuée dans les cellules quiescentes ou les cellules en cours de différenciation (Abelev 2000 ; Dimberg *et al.* 2003). L'expression de cet oncogène est régulée à plusieurs niveaux.

Tout d'abord, l'expression de c-Myc est régulée au niveau transcriptionnel par la voie des MAPKs avec notamment ERK1/2. L'activation de ERK1/2 conduit à une augmentation de l'expression de c-Myc, *via* l'activation du complexe AP-1 (activator protein-1) qui régule positivement la transcription de c-Myc, ou encore par le biais d'autres facteurs ou encore la voie Wnt/β-caténine qui régule sa transcription (Xia *et al.* 2010). L'expression de c-Myc est inhibée pendant la différenciation cellulaire. Dans le cas de la différenciation granulocytaire, c'est le facteur C/EBPα (CCAAT/enhancer binding protein α) qui réprime la transcription de c-Myc (Hoffman *et al.* 2002).

Par ailleurs, c-Myc est régulé au niveau post-transcriptionnel (Veyrune *et al.* 1997), *via* une régulation de la stabilité et de la traduction de l'ARNm par des protéines se fixant au domaine ARE de c-Myc. En effet, des AUBP (AU binding protein) comme par exemple TIA-1 et TIAR inhibent la traduction de c-Myc (Mazan-Mamczarz *et al.* 2006 ; Liao *et al.* 2007). La protéine TTP conduit à une dégradation de l'ARNm (Marderosian *et al.* 2006) et la protéine HuR stabilise l'ARNm c-Myc (Lafon *et al.* 1998).

Les miRs participent aussi à la régulation de c-Myc au niveau post-transcriptionnel. La fixation des miRs sur l'ARNm cible par complémentarité de bases, conduit à sa dégradation par le système Dicer/RISC (RNA-induced silencing complex) ou à une diminution de la

traduction de l'ARNm cible si la complémentarité de bases n'est pas parfaite (Mello *et al.* 2004). Plusieurs miRs induisent la dégradation ou inhibent la traduction de l'ARNm c-Myc. Il s'agit notamment de la famille let-7 qui peut conduire à une dégradation de l'ARNm de c-Myc, comme montré dans les cellules Hela (Kim *et al.* 2009 ; Buechner *et al.* 2011 ; Wong *et al.* 2011). La famille let-7 ainsi que miR34a ont aussi montré une capacité à inhiber la traduction de c-Myc (Christoffersen *et al.*).

Enfin, la stabilité de la protéine c-Myc est régulée par dégradation *via* le protéasome 26S (Malempati *et al.* 2006). Le domaine MB1 (myc box-1) de c-Myc peut être phosphorylé par ERK1/2 au niveau de la serine 62 qui stabilise la protéine. La déphosphorylation de ce résidu par la PP2A (protein phosphatase 2A) (Sears 2004) en combinaison avec la phosphorylation au niveau de la thréonine 58 par GSK3β conduit à la reconnaissance de la protéine par FBW7, une ubiquitine ligase (F-box and WD (tryptophan-aspartic acid) repeat domain-containing 7), ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome 26S (Sears 2004). La stabilité de c-Myc est aussi régulée par un système indépendant du protéasome 26S, qui est associée à la présence d'une séquence PEST (proline, acide glutamique, sérine, thréonine) sur l'ARNm de c-Myc.

Lors de la transition G1/S du cycle cellulaire, c-Myc permet la transcription de la cycline D (Daksis *et al.* 1994). La cycline D permet à son tour l'activation de Cdks dont la Cdk 4, 6 et 2 qui permettent la phosphorylation de pRB (retinoblastoma protein) (Cobrinik 2005). La phosphorylation de pRB conduit à la libération d'un facteur de transcription E2F (elongation 2 factor) qui permet la transcription des gènes de la réplication de l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire comme, Cdk4, Cdk6, la cycline E ou encore PCNA par exemple (proliferating cell nuclear antigen), une protéine également appelée « DNA sliding clamp » qui permet d'augmenter la processivité de l'ADN polymérase II (Kelman 1997) (Figure 12). Par ailleurs, c-Myc est aussi un répresseur de la transcription de p21 et de p27, des inhibiteurs de Cdk4 et Cdk6. L'hétérodimérisation de c-Myc avec Miz-1 conduit à une diminution de l'expression de ses gènes cibles, dont p15 et p21 (Staller *et al.* 2001; Gartel *et al.* 2003). La transition G1/S est ainsi favorisée.

1.2.2.2 La transition G2/M du cycle cellulaire

La progression de G2 vers la phase M est régulée par le complexe cycline B/Cdk1 (= Mitosis Promoting Fator) (Stewart, Westfall et al. 2003). Les complexes cycline B/Cdk1

s'accumulent progressivement pendant la phase G2. Ces complexes sont inactifs car phosphorylés par les kinases Wee1 et Myt1 sur la thréonine 14 et la tyrosine 15 de Cdk1. En parallèle, le complexe cycline H/ Cdk7 phosphoryle Cdk1 au niveau de la thréonine 161 (phosphorylation activatrice). Lors du déclenchement de la mitose, la phosphatase CDC25C active les complexes cycline B/Cdk1 en retirant les deux phosphorylations inhibitrices (Thr14 et Y15). L'activité kinase de Cdk1 va alors provoquer plusieurs événements responsables de l'entrée en mitose, comme la condensation des chromosomes, le réarrangement du cytosquelette, la désorganisation de la membrane nucléaire, le réarrangement de l'appareil de Golgi (Preisinger *et al.* 2005).

1.2.3 Surveillance du cycle cellulaire

La surveillance du cycle cellulaire a pour but de vérifier que chaque étape du cycle s'est correctement déroulée et met en jeu de nombreux mécanismes consistant à vérifier l'état de l'ADN pendant, avant, et après la réplication de l'ADN et à vérifier que les microtubules sont correctement attachés au niveau du kinétochore lors de la séparation des chromatides sœurs. Les mécanismes de surveillance permettent d'arrêter le cycle cellulaire en cas de problèmes à n'importe quelle phase du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M). Le cycle cellulaire est ainsi divisé par trois points de contrôle qui sont G1/S, G2 et le point de contrôle métaphase/anaphase.

C'est au niveau de la transition G1/S que se situe le premier point de contrôle. Des inhibiteurs de Cdks appelés « Cdki » (cyclin dependent kinase inhibitors) qui inhibent l'activité des Cdks (Stewart, Westfall et al. 2003) jouent ici un rôle très important. Le terme Cdki regroupe les protéines de la famille Cip/Kip (p21, p27, p57) et INK4 (p16, p15, p18, p19). La famille INK4 agissent notamment en inhibant l'activité de Cdk4 et Cdk6 spécifiquement pendant la phase G1, alors que les membres de la famille Cip/Kip inhibent l'activité des Cdks pendant toutes les phases du cycle cellulaire (Stewart, Westfall et al. 2003). Les facteurs de transcription de la famille p53 sont des suppresseurs de tumeurs qui jouent aussi un rôle crucial dans la surveillance du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S (Agarwal *et al.* 1995). La famille p53 regroupe les protéines p53, p63 et p73. Bien que le rôle des protéines p63 et p73 reste encore peu connu, des études ont démontré que ces deux isoformes jouent un rôle similaire à celui de p53 (Irwin *et al.* 2004). Lorsque l'ADN est endommagé, la protéine p53 est activée et augmente la transcription de p21 qui inhibe à son

tour les complexes cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk2. La conséquence de ces événements est une inhibition de la transition G1/S (Agarwal, Agarwal et al. 1995).

Le point de contrôle G2/M bloque la mitose tant que la réplication de l'ADN n'est pas achevée. Les altérations de l'ADN ou un blocage de la réplication de l'ADN vont conduire à l'activation des protéines kinases ATM (ataxia telangiectasia mutated) et ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) qui vont alors phosphoryler et activer les protéines Chk1 et Chk2 (checkpoint protein kinase). Il s'agit de protéines ayant une activité sérine-thréonine kinase et qui sont fixées à l'ADN. Après activation, elles phosphorylent la phosphatase CDC25C et génèrent ainsi un site de liaison pour la protéine 14-3-3 qui va alors séquestrer CDC25C dans le cytoplasme (Stewart, Westfall et al. 2003). En parallèle, l'activation de ATM/ATR conduit à une activation de p53 qui augmente l'expression de p21 qui inhibe à son tour l'activité du complexe cycline B/Cdk1. D'autre part, p53 augmente l'expression de la protéine 14-3-3, favorisant ainsi la séquestration de CDC25C dans le cytoplasme (Stewart, Westfall et al. 2003).

La surveillance métaphase/anaphase a pour but de vérifier l'attachement des chromosomes par les microtubules au niveau du kinétochore. En cas de mauvais attachement, la protéine Mad2 est activée et inhibe le complexe APC/CDC20 (anaphase promoting complex). Le complexe APC/CDC20 inhibe la sécurine, une protéine qui inhibe normalement l'activité de la séparase. La séparase est une enzyme indispensable à la séparation des chromatides sœurs. Ainsi, en cas de mauvais attachement des chromosomes au niveau des kinétochores, la sécurine n'est plus inhibé par APC/CDC20 et la séparase est donc inactive.

1.2.4 Prolifération cellulaire et cancer

La dérégulation du cycle cellulaire peut conduire à une prolifération anarchique. Les processus de régulation et de surveillance du cycle cellulaire sont souvent perturbés dans les cellules tumorales d'où l'importance de l'étude du cycle cellulaire en cancérologie pour la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'altération du cycle cellulaire dans les cellules tumorales est associée avec la dédifférenciation des cellules cancéreuses. Il peut s'agir d'altérations de la « machinerie » constitutive du cycle cellulaire ou d'altérations de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

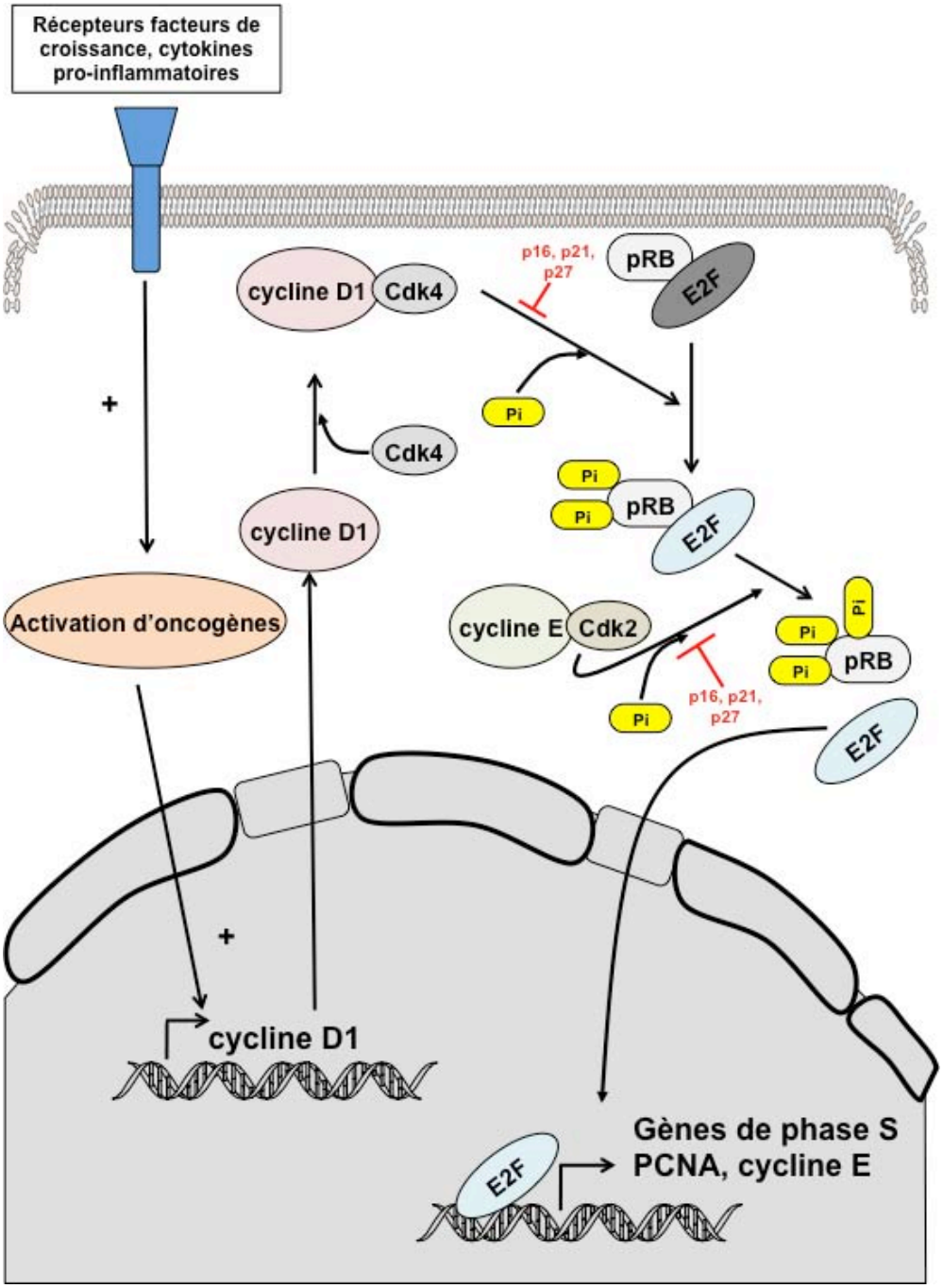


Figure 12 : La transition G1/S du cycle cellulaire

(D'après Stewart et al., 2003)

La cycline D permet l'activation de Cdks dont la Cdk 4, 6 et 2 qui permettent la phosphorylation de pRB. La protéine retient le facteur de transcription E2F et sa phosphorylation conduit à sa libération et à la transcription des gènes cibles important pour la phase S du cycle cellulaire comme PCNA par exemple. Les différents complexes cyclines/Cdks sont inhibés par p21 et p16, des protéines appelées Cdki.

1.2.4.1 Altérations de la machinerie constitutive du cycle cellulaire

Dans certains types de cancers, des cyclines, des Cdks ainsi que des régulateurs en aval de pRb peuvent être altérés (Buolamwini 2000). C'est par exemple le cas du cancer du sein, du poumon, des rétinoblastomes, des ostéosarcomes. 50% des cancers du sein sont caractérisés par une augmentation de l'expression de la cycline D (Stewart, Westfall et al. 2003). Des souris transgéniques qui surexpriment la cycline D ou la cycline E dans les cellules mammaires développent des adénocarcinomes (Stewart, Westfall et al. 2003). Par ailleurs, la plupart des cancers sont caractérisés par l'induction de l'expression de proto-oncogènes respectivement de leur mutation. Ces gènes deviennent des « oncogènes ». Dans le cas de la leucémie myéloïde chronique, la séquence du proto-oncogène c-Abl est transloqué du chromosome 9 vers le chromosome 22 et ce, à proximité du gène Bcr (McGahon, Bissonnette et al. 1994). La protéine c-Abl est une tyrosine kinase de la famille Src qui joue un rôle important dans la prolifération, la différenciation ou l'adhésion cellulaire (McGahon, Bissonnette et al. 1994).

D'autre part, dans le lymphome de Burkitt, l'EBV est responsable d'une surexpression de l'oncogène c-Myc (Klapproth *et al.* 2010 ; Smith *et al.* 2010).

1.2.4.2 Altérations des protéines impliquées dans la surveillance du cycle cellulaire

Les altérations de gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la surveillance et la régulation du cycle cellulaire sont communes dans différents cancers. La mutation de p53 est la mutation la plus répandue (Stewart, Westfall et al. 2003). Des mutations de p53 dans les cellules germinales conduisent au syndrome de Li-Fraumeni prédisposant au cancer et se transmettant selon un mode autosomique dominant (Bell *et al.* 1999). Les malades développent des tumeurs du cerveau ou du poumon, mais aussi des sarcomes et des leucémies. D'autres tumeurs ne présentent pas de mutations du gène p53. Cependant l'activité de la protéine p53 peut être inhibée. Certaines tumeurs surexpriment le gène Mdm2 (murine double minute 2). La protéine Mdm2 est un régulateur négatif de p53 qui se lie directement à p53, conduisant ainsi à sa dégradation par le protéasome (Stewart, Westfall et al. 2003).

1.2.5 COX-2 et prolifération cellulaire

Les prostaglandines jouent un rôle important dans l'induction de la prolifération des cellules tumorales de plusieurs types de cancers comme le cancer du sein et le cancer colorectal. Par ailleurs, les prostaglandines augmentent la prolifération des cellules normales comme les hépatocytes par exemple et permet ainsi la régénération hépatique (Casado *et al.* 2001). La prolifération des cellules 3T3 (fibroblastes) est inhibée par les inhibiteurs de COX-2 (Cao, 2002). Le composé NS-398 diminue la prolifération des cellules MC-26 (lignée cellulaire de cancer colorectal de souris) qui expriment constitutivement COX-2 (Yao, Lam et al. 2004). Cet effet est associé à une diminution du niveau d'expression de la cycline D, une protéine importante pour la transition G1/S du cycle cellulaire, ainsi qu'une diminution de PCNA qui joue un rôle important dans la phase S en augmentant la processivité de l'ADN polymérase (Kelman 1997). Le NS-398 et la nabumétone (un autre inhibiteur de COX-2) sont capables d'inhiber la prolifération des cellules U937 (leucémie myéloïde aiguë) et ML1 (leucémie myéloblastique). L'inhibition est associée à une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Nakanishi, Kamijo et al. 2001). Une inhibition de la prolifération cellulaire a aussi pu être observée dans les cellules HepG2 (carcinome hépatocellulaire) traitées au méloxicam. L'effet est corrélé à une diminution de l'expression de PCNA et de la cycline A ainsi qu'à une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Li *et al.* 2006). Le lien entre COX-2 et le cancer colorectal (CRC) a été montré par le fait que les prostaglandines issues du métabolisme de l'AA par COX-2 augmentent la prolifération de ces cellules tumorales (Castellone *et al.* 2005). Par ailleurs, l'effet inhibiteur des NSAIDs sur la prolifération des cellules de CRC a aussi été observé dans les cancers de l'ovaire. En effet, le traitement des cellules OVCAR-3 xenotransplantées dans des souris immunodéficientes à l'aspirine ou au piroxicam (NSAID) ou encore au méloxicam, un inhibiteur sélectif de COX-2 conduit à une diminution de la croissance de ces tumeurs (Xin *et al.* 2007). Près de 40% des cancers du sein présentent une surexpression de COX-2 qui est associée à un mauvais pronostic (Howe 2007). L'indométacine, le célécoxib, le rofécoxib et le nimésulide sont capables d'inhiber la prolifération de ces cellules tumorales (Howe 2007). D'autre part, les prostaglandines sont capables d'augmenter la prolifération des cellules de cancer du sein dépendante des hormones en augmentant la transcription de l'aromatase CYP19, une enzyme responsable de la biosynthèse des oestrogènes (Falandry *et al.* 2009).

Plusieurs études ont révélé que la prolifération cellulaire des lignées cellulaires RAJI (lymphome de Burkitt), BlAB (lymphome de Burkitt ne contenant pas l'EBV) et BL41

(lymphome de Burkitt) est inhibée par le célécoxib (Wun, McKnight et al. 2004). Le NS-398 et le célécoxib inhibent aussi la prolifération des cellules Panc-1 (cancer pancréatique) (Xu, Xie et al. 2008). Le traitement par le célécoxib de ces mêmes cellules, implantées dans des souris immunodéficientes, conduit à une diminution du volume tumoral (Xu, Xie et al. 2008). D'autres études ont démontré un effet anti-proliératif du célécoxib sur la lignée cellulaire K562 (leucémie myéloïde chronique) (Zhang *et al.* 2006) associé à une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, une diminution de l'expression de la cycline D1, de la cycline E, de pRb et une augmentation de l'expression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire p16 et p27 (Zhang, Liu et al. 2006). Des résultats similaires ont été observés sur cette même lignée cellulaire avec le DUP-697, un autre inhibiteur de COX-2 (Peng, Zhang et al. 2008). COX-2 ne permet pas toujours d'induire la prolifération cellulaire. En effet, les effets peuvent être différents selon le type cellulaire. L'induction de COX-2 inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses des artères (Cao and Prescott 2002). Les effets de certains inhibiteurs de COX-2 sur le cycle cellulaire sont représentés dans la figure 13.

La prolifération cellulaire étant étroitement liée à la différenciation cellulaire, les inhibiteurs de COX-2 ont montré une capacité à potentialiser la différenciation induite par plusieurs agents. Ainsi, l'indométacine et l'aspirine augmentent la différenciation myéloïde des cellules induite par le 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D). Une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire est associée à la différenciation des ces cellules (Jamshidi *et al.* 2008). Dans une autre étude, des résultats similaires ont été obtenus avec le DUP-697, un autre inhibiteur spécifique de COX-2, dans des cellules leucémiques humaines (leucémie myéloïde aigüe : lignées cellulaire U937 et HL-60 (Jamshidi, Zhang et al. 2008).

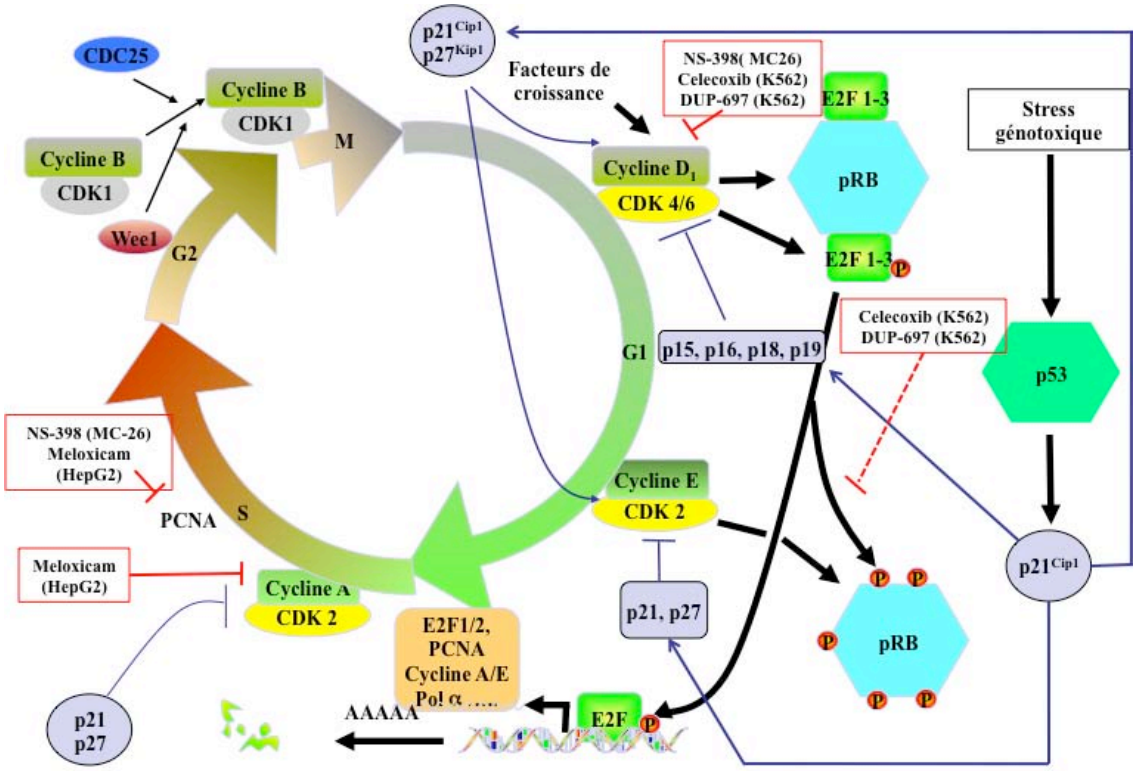


Figure 13 : Effets d'inhibiteurs de COX-2 sur le cycle cellulaire

(D'après Sobolewski et al., 2010 avec modifications)

Le cycle cellulaire est divisé en différentes étapes (G1, S, G2, Mitose). Ce mécanisme est régulé par plusieurs protéines dont les cyclines, qui activent les Cdks, des phosphatases (*par exemple*, CDC25), des inhibiteurs de Cdks comme p15, p16, p18, p19, p21, p27 (Stewart, Westfall et al. 2003). Les inhibiteurs de COX-2 peuvent moduler les transitions du cycle cellulaire. Cette figure représente quelques exemples de modulation dans différents types cellulaires : MC26, cancer colorectal ; HepG2, carcinome hepatocellulaire ; K562, leucémie myeloïde chronique. Cdk, cyclin dependent kinase; pRb, retinoblastoma protein; PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

1.3 Implication de COX-2 dans l'apoptose

La mort cellulaire désigne d'une manière générale l'ensemble des phénomènes conduisant à la destruction de la cellule. Différents types de morts cellulaires sont actuellement connus avec notamment la nécrose, l'apoptose, ou encore l'autophagie. La cancérogenèse résulte d'un déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. Les cellules tumorales prolifèrent de manière incontrôlée et résistent à l'apoptose. COX-2 joue un rôle dans ce déséquilibre en inhibant l'apoptose par de nombreux mécanismes.

1.3.1 L'apoptose

L' apoptose ou « mort cellulaire de type I » est un mécanisme important dans le développement embryonnaire et l'homéostasie cellulaire chez les métazoaires (Majno *et al.* 1995; Dimmeler *et al.* 1999). En effet, ce mécanisme permet l'élimination des cellules défectueuses, prévenant ainsi la formation de tumeurs. Elle est déclenchée par des signaux extracellulaires (cytokines comme le TNFα par exemple) ou intracellulaires (anomalies dans l'ADN). L'apoptose est aussi déclenchée par la plupart des agents chimiothérapeutiques utilisés en clinique.

L'apoptose met en jeu des protéases à cystéine appelées « caspases » qui sont considérées comme les protéines effectrices de l'apoptose. L'activation des caspases se fait par clivage, soit par une autre caspase (réaction en cascade), soit par autoactivation. Les substrats de ces protéines sont nombreux et parmi ces substrats, il y a les lamines nucléaires, les enzymes de réplication de l'ADN comme la topoisomérase I, des enzymes de réparation de l'ADN comme la protéine PARP (Poly (ADP Ribose) polymérase) ou encore des protéines du cytosquelette comme l'actine. La phase effectrice de l'apoptose est caractérisée par des changements morphologiques tels que une fragmentation nucléaire, une condensation de la chromatine, la destruction du cytosquelette et l'exposition des phosphatidyl sérines nécessaires à la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules du système immunitaire (*par exemple*, les macrophages) (Fullard *et al.* 2009) (Figure 14). Contrairement à la nécrose, ce type de mort cellulaire ne passe pas par la libération des constituants internes de la cellule dans le milieu extracellulaire et est donc dépourvu de réactions inflammatoires.

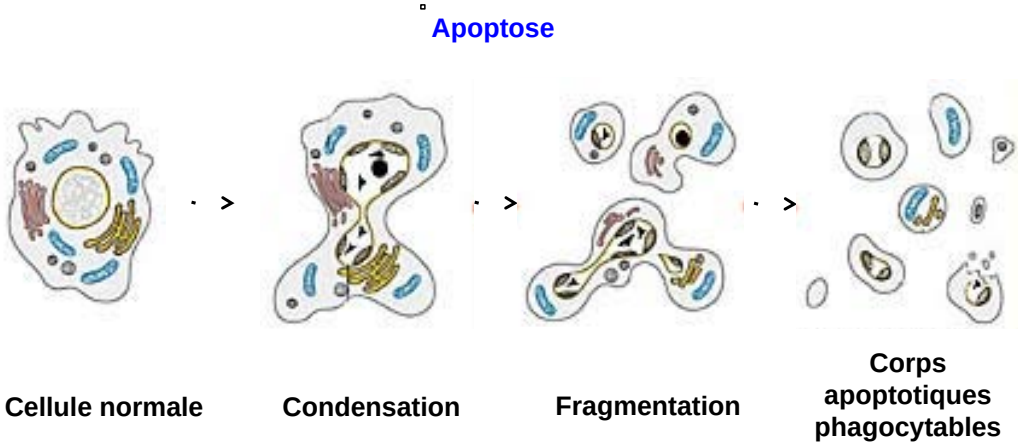


Figure 14 : L'évolution morphologique durant l'apoptose

(D'après Searle et al., 1982 avec modifications)

Morphologiquement, les cellules entrant en apoptose sont caractérisées par une modification de la répartition des phospholipides membranaires (externalisation des phosphatidyl sérines), une condensation de la chromatine et du cytoplasme, une fragmentation de l'ADN (au niveau de segments inter-nucléosomiques), la formation de corps apoptotiques contenant les organites intracellulaires intacts pouvant être phagocytés par les cellules du système immunitaire (*par exemple*, les macrophages).

1.3.1.1 Les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque

Deux voies apoptotiques initiées par différents stimuli et impliquant différentes protéines sont principalement connues (Coppola *et al.* 2000).

La première voie est une voie extrinsèque (apoptose physiologique) (Figure 15) mettant en jeu des interactions entre des ligands et leurs récepteurs de surface. Ces récepteurs de mort comportent un domaine de mort (death domain, DD) dans leur domaine intracellulaire comme le TNFα et son récepteur par exemple ou encore FasL (ligand du récepteur Fas). Ces récepteurs activés vont être à l'origine d'un signal intracellulaire responsable du processus apoptotique. La voie extrinsèque nécessite la formation d'un complexe protéique appelé « DISC » (death inducing silencing complex) au niveau du domaine intracellulaire du récepteur membranaire. Ce complexe est composé de protéines adaptatrices qui se lient au domaine de mort du récepteur. Pour le récepteur du TNFα, il s'agit de TRADD (TNF receptor-associated death domain) et pour le récepteur du ligand Fas, il s'agit de la protéine FADD (Fas-associated death domain). Ces complexes vont permettre le recrutement de la pro-caspase-8 effectrice et son activation. La caspase-8 active va permettre l'activation de la pro-caspase-3 par clivage, qui permet de passer à la phase effectrice de l'apoptose. La voie extrinsèque est fréquemment déclenchée par le système immunitaire à cause de la production de cytokines comme le TNFα ou FasL.

L'apoptose peut aussi être déclenchée par des signaux intracellulaires comme l'altération de l'ADN ou le stress induit par des agents chimiothérapeutiques mais aussi des stress chimiques et physiques (*par exemple*, les ERO, les UVs, les radiations ionisantes, les agents chimiothérapeutiques). La voie intrinsèque est caractérisée par des altérations de la mitochondrie avec la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) associée à une perte du potentiel membranaire mitochondrial (Burlacu 2003). Ces événements conduisent à la libération du cytochrome c par la mitochondrie dans le cytosol, un composant essentiel de l'apoptosome, un complexe qui est composé de l'APAF (apoptotic protease activating factor) et de la pro-caspase-9. La pro-caspase-9 est ensuite activée en caspase-9 qui va alors activer la caspase-3.

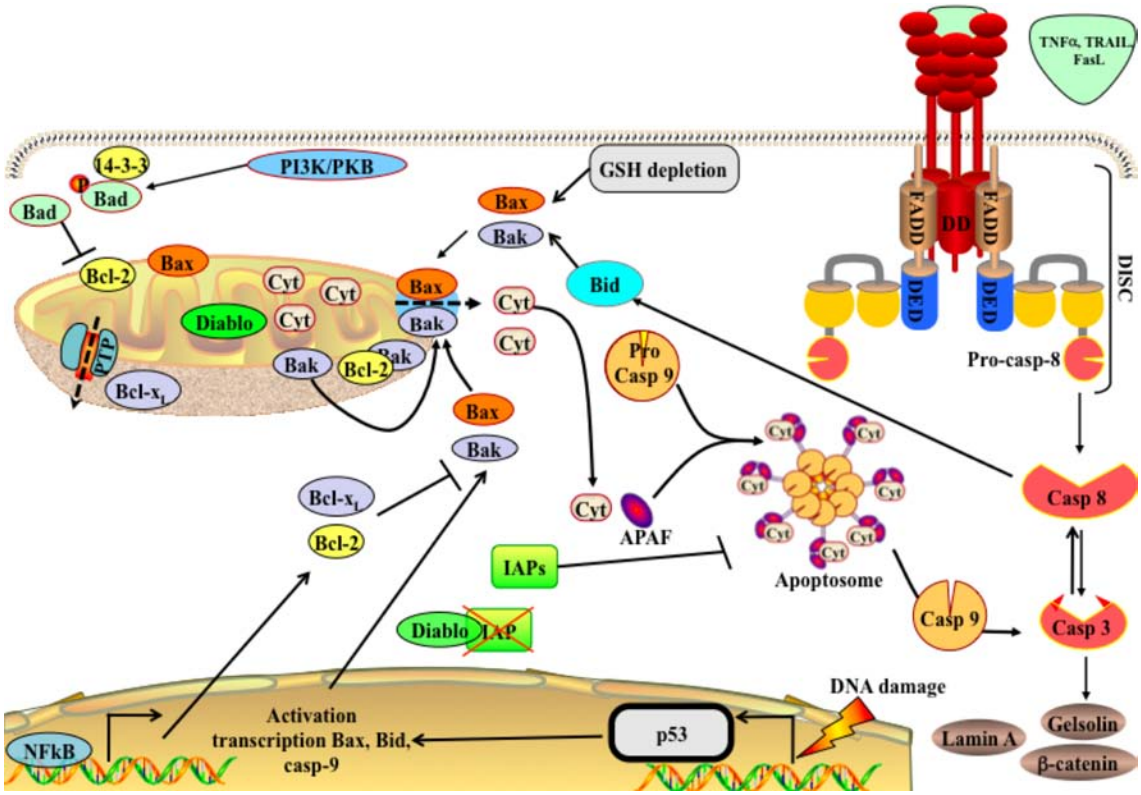


Figure 15 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (D'après Coppola, Ghibelli., 2000 avec modifications)

(D'après Sobolewski et al., 2010 avec modifications)

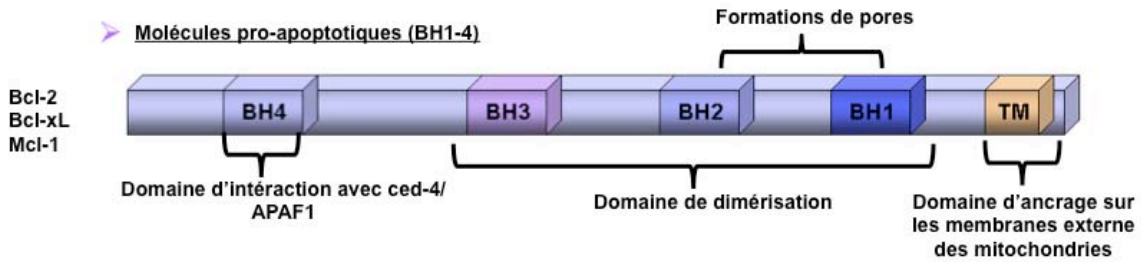
L'apoptose peut s'effectuer selon deux voies : une voie intrinsèque indépendante de la caspase-8 et la voie extrinsèque dépendante de la caspase-8. Ces deux voies ne sont pas séparées de manière stricte. Il peut y avoir des relations entre ces deux voies qui visent à amplifier la réponse apoptotique. La protéine « Bid » peut faire ce lien par exemple.

AIF: apoptosis inducing factor; Bcl-2, B cell lymphoma 2 ; Bid, Bcl-2 interacting domain; Casp, caspase; Cyt, cytochrome c; DD, death domain; DED, Death effector domain; DISC, death inducing silencing complex; PI3K/PKB, phosphatidyl inositol-3 kinase/protein kinase B; FADD, Fas-associated death domain; GSH, glutathione; PTP, Pore de transition de perméabilité; TNF, tumor necrosis factor; TRAIL, TNF-related-inducing-apoptosis-ligand.

L'apoptose est un processus qui requiert l'activation et la translocation vers la mitochondrie des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer). L'activation de ces protéines passe notamment par un changement conformationnel exposant ainsi d'autres épitopes. Pour la protéine Bax, il s'agit de l'épitope 6A7 (Peyerl *et al.* 2007). Pour Bak, il s'agit de l'épitope Ab-1 (Griffiths *et al.* 1999). L'apoptose intrinsèque serait aussi associée à un déséquilibre oxydo-réducteur induit par une diminution du taux de glutathion (GSH) intracellulaire (Ghibelli *et al.* 1998 ; Coppola and Ghibelli 2000 ; D'Alessio *et al.* 2004). La déplétion en GSH va être responsable d'un stress oxydant qui va conduire à l'activation et la translocation de la protéine Bax qui fait partie de la famille Bcl-2 (Figure 16) qui forme alors des oligomères, qui vont permettre la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) ainsi que la libération du cytochrome c. La protéine Bak joue le même rôle que Bax (Zhou *et al.* 2008) ; cependant, cette protéine est déjà présente à la surface de la mitochondrie où elle est séquestrée sous sa forme monomérique par les membres de la famille Bcl-2 ayant des propriétés anti-apoptotiques comme Bcl-xL et Mcl-1 (Shamas-Din *et al.* 2011).

Plusieurs kinases jouent un rôle important dans l'induction de l'apoptose intrinsèque (Kanda *et al.* 2004). Les kinases JNK et p38MAPK peuvent contrôler l'activation des facteurs pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Yamamoto *et al.* 1999 ; De Chiara *et al.* 2006). Les protéines à domaine BH3 seul (Figure 16) sont essentielles à l'activation des protéines Bax et Bak. La protéine Bim par exemple se fixe au domaine BH3 de Bax et induit un changement conformationnel responsable de son activation. JNK contrôle l'activation de Bax en régulant positivement la transcription de Bim et en phosphorylant Bim qui peut alors interagir avec Bax (Okuno *et al.* 2004). D'autres études réalisées sur des modèles de fibroblastes où l'apoptose a été induite par des UVs ont aussi montré que l'apoptose dépendante de JNK passe par une régulation de l'activation de Bax et de Bak (Lei *et al.* 2002). Les protéines anti-apoptotiques sont aussi régulées par JNK. En effet, la protéine Bcl-2 peut être inactivée par phosphorylation sur plusieurs résidus par JNK après exposition à des molécules qui altèrent les microtubules (paclitaxel et taxotère) (Yamamoto, Ichijo et al. 1999). Il s'agit notamment de la sérine 70, de la sérine 87 et de la thréonine 69 (Yamamoto, Ichijo et al. 1999). Ces phosphorylations jouent un rôle important dans l'interaction de Bcl-2 avec les protéines Bax (Shitashige *et al.* 2001; Salah-Eldin *et al.* 2003) mais aussi dans la dégradation de Bcl-2 par le protéasome 26S (Breitschopf *et al.* 2000).

A



B

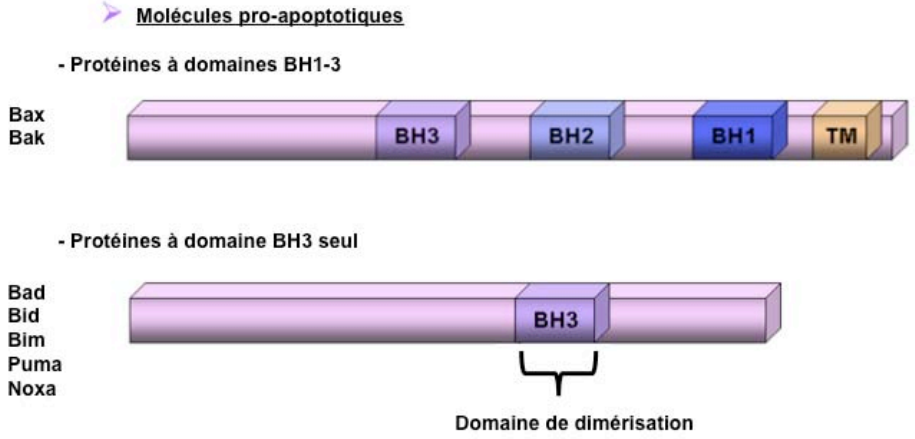


Figure 16: Structures de quelques protéines de la famille Bcl-2

(*D'après Shamas-Din, 2011 avec modifications)*

Les protéines de la famille Bcl-2 présentent des régions très conservées appelées « BH » (Bcl-2 homology domain) (Burlacu, 2004). En fonction du nombre de domaines BH, trois sous catégories peuvent être distinguées. Il y a tout d'abord les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 qui contiennent quatre domaines BH et interagissent avec d'autres protéines de la famille Bcl-2 pour inhiber la perte du potentiel membranaire mitochondriale (**A**). Il y a ensuite les protéines ayant des propriétés pro-apoptotiques (**B**). Ce groupe est subdivisé en deux sous catégories avec d'une part les protéines Bax et Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) qui contiennent trois domaines BH et d'autre part, les protéines Bim, Bad, Bid, Noxa, Puma, qui ne possèdent que le domaine BH3, d'où leur nom de « BH3 only proteins ».

Par ailleurs, la phosphorylation de Bcl-2 sur la sérine 70 est un événement qui régule la progression du cycle cellulaire (Breitschopf, Haendeler et al. 2000) et serait associé à une inhibition de l'apoptose. Au contraire, dans des modèles cellulaires dépendent de cytokines, comme par exemple l'Il-3, la phosphorylation de la sérine 70 de Bcl-2 prévient l'apoptose (Ruvolo *et al.* 2001). Toutes ces données suggèrent donc que les effets de la phosphorylation de Bcl-2 dépendent du contexte cellulaire et de la nature des stimuli et voies de signalisation impliquées (Blagosklonny 2001) et que l'effet pro-apoptotique est régulé par la phosphorylation de Bcl-2 sur plusieurs sites.

Un effet analogue a été observé pour Bcl-xL dans des cellules prostatiques surexprimant Bcl-xL (DU145-2). Dans ce modèle, Bcl-xL est phosphorylée par JNK au niveau de la sérine 62 après exposition au paclitaxel (Basu *et al.* 2003). Comme pour Bcl-2, cette phosphorylation apparaît surtout pendant la phase G2/M du cycle cellulaire et conduit à l'inactivation de Bcl-xL.

La voie extrinsèque et la voie intrinsèque convergent vers l'activation de la pro-caspase-3. La séparation entre ces deux voies n'est pas stricte. En effet, il y a des relations entre ces deux voies permettant de renforcer la réponse apoptotique (Coppola and Ghibelli 2000). La caspase-8 peut par exemple déclencher la protéolyse du facteur pro-apoptotique « Bid » (Bcl-2 interacting domain) en t-Bid (forme tronquée) appartenant à la famille Bcl-2 (Henshall *et al.* 2001). La protéine tronquée est alors transloquée vers la mitochondrie et favorise l'activation de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bak et Bax qui induisent la libération du cytochrome c, à l'origine de la formation de l'apoptosome (Henshall, Bonislawski et al. 2001; Burlacu 2003). Par ailleurs, la voie intrinsèque peut activer la caspase-8 après activation de la caspase-3 (Cha *et al.* 2001). Ces relations entre les deux voies permettent d'augmenter l'efficacité de l'apoptose.

Les cellules d'un organisme sont continuellement soumises à de multiples formes de stress. Une régulation stricte de l'apoptose est donc importante pour éviter les signaux apoptotiques indésirables. La régulation de l'apoptose passe par des interactions entre protéines. Certaines de ces interactions inhibent l'apoptose comme l'interaction Bax/Bcl-2 par exemple. La protéine Bax peut aussi former des oligomères avec la protéine Bcl-xL (Billen, Kokoski et al. 2008). De manière similaire, la protéine Bak est régulée par Bcl-xL et Mcl-1 (Burlacu 2003). Les interactions entre Bax ou Bak et les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont régulées par les protéines apoptotiques de la famille Bcl-2 ne possédant que le domaine BH3 (« BH3-only proteins ») (*par exemple*, PUMA). En aval, l'activation des caspases est aussi régulée par des interactions avec des interactions inhibitrices de l'apoptose

avec des membres de la famille IAP (inhibitors of apoptosis) comme par exemple la survivine ou XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) (Tamm *et al.* 1998). L'action des IAPs est inhibé par l'hétérodimère pro-apoptotique SMAC (second mitochondria-devided activator of caspases) /DIABLO (Coppola and Ghibelli 2000) qui est libéré par la mitochondrie lorsque la perméabilité de la membrane externe mitochondriale est affectée (Chai *et al.* 2000) favorisant ainsi l'apoptose.

Des signaux de survie permettent aussi de réguler l'apoptose. C'est par exemple le cas de plusieurs voies de signalisation inflammatoires qui, par induction de NF-κB, permettent l'augmentation de l'expression de Bcl-2. C'est aussi le cas de la voie de survie PI3K, une enzyme qui convertit le PIP2 (phosphatidyl-isositol (4,5 biphosphate)) en PIP3 (phosphatidyl-isositol- (3,4,5 triphosphate)). Le PIP3 va ensuite activer par phosphorylation de PKB qui phosphoryle à son tour divers substrats dont la protéine pro-apoptotique Bad qui sera alors séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3, empêchant ainsi la protéine Bad de déclencher l'apoptose (She, Solit et al. 2005). L'apoptose est aussi régulée par d'autres phénomènes. D'autres travaux ont montré que l'apoptose induite par un stress peut être inhibée lors de processus comme la différenciation cellulaire, la sénescence ou encore l'autophagie (Ketley *et al.* 2000).

1.3.1.2 Apoptose et cancer

La perturbation des mécanismes régulateurs ou effecteurs de l'apoptose est à l'origine de plusieurs maladies comme des maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde), des maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Dubois, Abramson et al. 1998), la sclérose latérale amyotrophique (SLA ou maladie de Charcot) caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs du cortex cérébral et de la corne antérieure de la moelle épinière (Cau, Seite., 2007), le cancer.

La diminution de l'apoptose est un facteur important durant la cancérogenèse. En effet, les cellules cancéreuses sont caractérisées par une insensibilité aux signaux apoptotiques physiologiques comme par exemple le TNFα, FasL, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Wiezorek *et al.* 2010). Un déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose se crée alors et favorise ainsi la promotion tumorale.

La perturbation des mécanismes de l'apoptose contribue aussi à la progression tumorale. En effet, une perte de fonction de la « machinerie » apoptotique (*par exemple*, p53, Bax), mais aussi une altération de la « balance » signaux apoptotiques / signaux de survie

comme par exemple une surexpression de la protéine Bcl-2 dans une cellule tumorale peut être responsable d'une diminution de l'apoptose induite par des agent chimiothérapeutiques (Kitagawa *et al.* 1996; Ciardiello *et al.* 2002). Dans certains cancers, comme par exemple le cancer du côlon, une diminution de l'expression de Bax peut aussi être observée (Rampino *et al.* 1997).

Par ailleurs, l'altération de facteurs impliqués dans le mécanisme apoptotique pourrait aussi avoir un impact sur l'efficacité de la chimiothérapie. C'est le cas par exemple du gène suppresseur de tumeur p53, un gène impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Agarwal, Agarwal et al. 1995) et l'induction de l'apoptose. La perte de fonction de p53 par mutation(s) ou délétion(s) est observée dans de nombreux modèles de cancers (Kitagawa, Wong et al. 1996; Stewart, Westfall et al. 2003). L'expression de la protéine Bcl-2 est aussi augmentée dans plusieurs types de cancers, conduisant ainsi à une chimiorésistance (Ciardiello and Tortora 2002).

1.3.2 COX-2 et l'apoptose intrinsèque

COX-2 joue aussi un rôle important dans le contrôle de l'apoptose intrinsèque dans plusieurs types de cancers. L'un des facteurs fréquemment affecté par les inhibiteurs de COX-2 est la protéine Bcl-2.

Le NS-398 est par exemple responsable d'une diminution de l'expression de Bcl-2 dans une lignée cellulaire de cancer de la prostate sensible aux androgènes (LNCaP) exprimant COX-2 de manière constitutive (Liu *et al.* 1998). Des effets similaires ont été décrits dans des cellules cancéreuses colorectales (cellules HCA-7 qui expriment COX-2). La PGE2 est capable d'inhiber l'apoptose induite par le SC58125, un inhibiteur sélectif de COX-2, et d'augmenter l'expression de Bcl-2 (Sheng, Shao et al. 1998). Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer l'effet pro-apoptotique des inhibiteurs de COX-2. L'inhibition de COX-2 a été associée à une augmentation du taux intracellulaire d'AA dans les cellules HT-29, une lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome colorectal (Martin *et al.* 2005) ou encore dans les cellules SH-SYSY, une lignée cellulaire humaine de neuroblastomes (Johnsen *et al.* 2005). L'accumulation d'AA est associée à une induction d'apoptose de ces cellules. L'AA peut affecter la réponse apoptotique en activant la sphingomyélinase, une enzyme responsable de la production de céramides (Jayadev *et al.* 1994). L'accumulation de céramides dans les cellules est connue pour avoir un effet pro-apoptotique (Pettus *et al.* 2002). Le sulfure de

sulindac, un métabolite du sulindac est capable d'activer la sphingomyélinase et ainsi d'augmenter le taux de céramide intracellulaire dans les lignées cellulaire HCT116 et SW480 (carcinomes colorectaux humains) (Chan *et al.* 1998).

COX-2 peut également moduler l'apoptose en diminuant le taux intracellulaire de monoxyde d'azote *via* une diminution de l'activité de la synthase de monoxyde d'azote (NOS pour Nitric Oxide Synthase). Le monoxyde d'azote est connu pour son rôle pro-apoptotique dans différents modèles de cancers, dont le cancer colorectal (Brune *et al.* 1999). Le lien entre COX-2 et le monoxyde d'azote a été étudié par Chang *et al* (Chang *et al.* 2000). L'étude a révélé que la PGE2 inhibe l'apoptose induite par le NGF (nerve growth factor) des cellules PC12 (phéochromocytome de glande surrénale de rat) en augmentant le taux de dynéine à chaîne légère, un inhibiteur de la NOS (Chang, Jakobi et al. 2000). Cet effet se traduit par une diminution du taux de monoxyde d'azote dans les cellules (Chang, Jakobi et al. 2000).

Par ailleurs, le lien entre les inhibiteurs de COX-2 et les membres de la famille p53 a été étudié. Le célécoxib est par exemple capable de moduler l'expression de différentes isoformes de p73, un membre de la famille p53 dans des lignées cellulaires de neuroblastomes (Lau *et al.* 2009) : Tap73 est pro-apoptotique et contient un domaine de transactivation. Cette protéine est considérée comme un gène suppresseur de tumeurs car elle est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'induction de l'apoptose (Irwin and Miller 2004). DeltaNp73 est une protéine anti-apoptotique qui est dépourvue du domaine de transactivation et qui est surexprimée par les neuroblastomes, provoquant ainsi une chimiorésistance (Lau, Wolter et al. 2009). Le célécoxib est capable d'augmenter l'expression de Tap73 et de diminuer celle de DeltaNp73 (Irwin and Miller 2004).

L'effet apoptotique des inhibiteurs de COX-2 a aussi été observé dans les cancers hématopoïétiques. Le DUP-697 est par exemple capable d'induire l'apoptose des cellules K562 (lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique) en provoquant un arrêt du cycle cellulaire et l'activation de la pro-caspase-8 (Peng, Zhang et al. 2008).

Les inhibiteurs de COX-2 ont montré une capacité à moduler des voies de survie dans certains modèles cellulaires. L'une de ces voies de signalisation est la voie PI3K/Akt qui est souvent activée dans les cellules cancéreuses (She, Solit et al. 2005). La PI3K produit du PIP3 qui va activer à son tour la PDK1 (pyruvate déshydrogenase kinase). La PDK1 est responsable de la phosphorylation activatrice de PKB qui est alors capable de moduler l'apoptose en phosphorylant plusieurs cibles comme par exemple la protéine Bad. Le célécoxib est capable d'inhiber cette voie de signalisation dans un modèle de cancer gastrique (Kim *et al.* 2009) mais aussi dans les cellules MG-63 (ostéosarcome) par une diminution de

l'expression de PI3K (Liu *et al.* 2008). De plus, le célécoxib peut induire l'apoptose des cellules LNCaP et PC3 (lignées cellulaires de cancer de la prostate), en inhibant la phosphorylation de PKB. La voie PI3K est régulée par PTEN (phosphatase and TENsin homolog) qui convertit le PIP3 en PIP2. Ce mécanisme se traduit par une diminution de l'activation de PKB et de la phosphorylation de Bad qui n'est alors plus séquestré dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 et qui peut donc produire son effet apoptotique. Le composé NS-398 est capable d'induire l'expression de PTEN dans les cellules MKN45 (lignée de carcinome gastrique). Par ailleurs, le sulfone de sulindac, un métabolite du sulindac, l'indométacine et le SC-236 peuvent induire l'apoptose des cellules HT-29 en activant Bad et en diminuant l'expression de la protéine 14-3-3 (Liou *et al.* 2007). L'expression de la protéine 14-3-3 est régulée par le récepteur nucléaire PPARδ. COX-2 produit des PGI2 qui se lient à PPARδ et l'activent. Dans cette étude, il a été suggéré que l'inhibition de COX-2 se traduit par une diminution de la synthèse de PGI2 et donc de l'activation de PPARδ, conduisant ainsi à une diminution de l'expression de la protéine 14-3-3 (Liou, Ghelani et al. 2007).

La fixation des prostaglandines sur certains de leurs récepteurs (IP, DP, EP2, EP3. EP4) conduit à une augmentation du taux d'AMPc et une activation de PKA (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006). Des études ont suggéré que les PKAs, comme les PKBs, peuvent phosphoryler la protéine Bad, conduisant à sa séquestration et donc à une inhibition de l'apoptose (Park *et al.* 2009).

Les effets des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose intrinsèque sont représentés dans la figure 17.

1.3.3 COX-2 et l'apoptose extrinsèque

Il a été démontré que les inhibiteurs de COX-2 peuvent sensibiliser plusieurs types de cellules à l'apoptose extrinsèque. Ainsi, le composé DUP-697 est par exemple capable d'augmenter l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules HT-29. La sensibilisation est permise par une accumulation d'AA dans les cellules qui active la sphingomyélinase, ce qui déclenche un regroupement des récepteurs DR5 dans des régions riches en céramides et en cholestérol (Martin, Phillips et al. 2005).

COX-2 peut aussi être associée à une résistance des cellules tumorale à l'apoptose extrinsèque. Ainsi une autre étude a montré que la surexpression de COX-2 dans des cellules

cancéreuses colorectales conduit à une diminution de l'expression de DR5. Cet effet s'accompagne d'une résistance des cellules à l'apoptose induite par TRAIL (Martin, Phillips et al. 2005). Cependant, le NS-398 et le CAY10404 peuvent sensibiliser les cellules SK-Hep1 et HLE (hepatocarcinomes) à l'apoptose induite par TRAIL en activant l'expression des récepteurs de TRAIL (DR4 et DR5) (Yamanaka *et al.* 2006).

Dans le même type cellulaire (hepatocarcinomes), Li *et al* ont montré que l'inhibition de COX-2 par le méloxicam conduit à une augmentation de l'apoptose induite par FasL des cellules HepG2, Bel7402 et SMMC-7402. Des études *in vivo* sur des souris transgénique exprimant constitutivement COX-2 ont permis de montrer une résistance à l'apoptose induite par FasL dans le foie (Casado *et al.* 2007).

Les voies de survie cellulaire peuvent aussi être impliquées dans la modulation de l'apoptose extrinsèque. C'est par exemple le cas de la voie PI3K/Akt. En effet, la lignée cellulaire MKN45 (carcinome gastrique) qui exprime COX-2 peut être sensibilisée à l'apoptose induite par FasL par le NS-398. L'inhibiteur de COX-2 est responsable d'une diminution de l'expression de PTEN et conduit à une diminution de la phosphorylation de Bad et donc à l'apoptose (Honjo *et al.* 2005). Les effets des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose extrinsèque sont représentés dans la figure 17

1.4 COX-2 et la chimiothérapie

COX-2 étant surexprimée dans de nombreux cancers, les inhibiteurs de COX-2 ont montré des effets bénéfiques en réduisant la prolifération cellulaire ou en induisant diverses voies de mort cellulaire, comme discuté dans la section 1.2 et 1.3. Ces effets ont suggéré l'utilisation de ces inhibiteurs seuls ou en combinaison avec les thérapies antitumorales déjà existantes. Ainsi les inhibiteurs de COX-2 permettent de sensibiliser de nombreux types de cellules tumorales à la radiothérapie, à la thérapie photodynamique et à la chimiothérapie (Sobolewski *et al.* 2010). Les cancers du sang sont principalement traités par chimiothérapie. Par conséquent, nous n'évoquerons que les données bibliographiques concernant le lien entre COX-2 et la chimiothérapie.

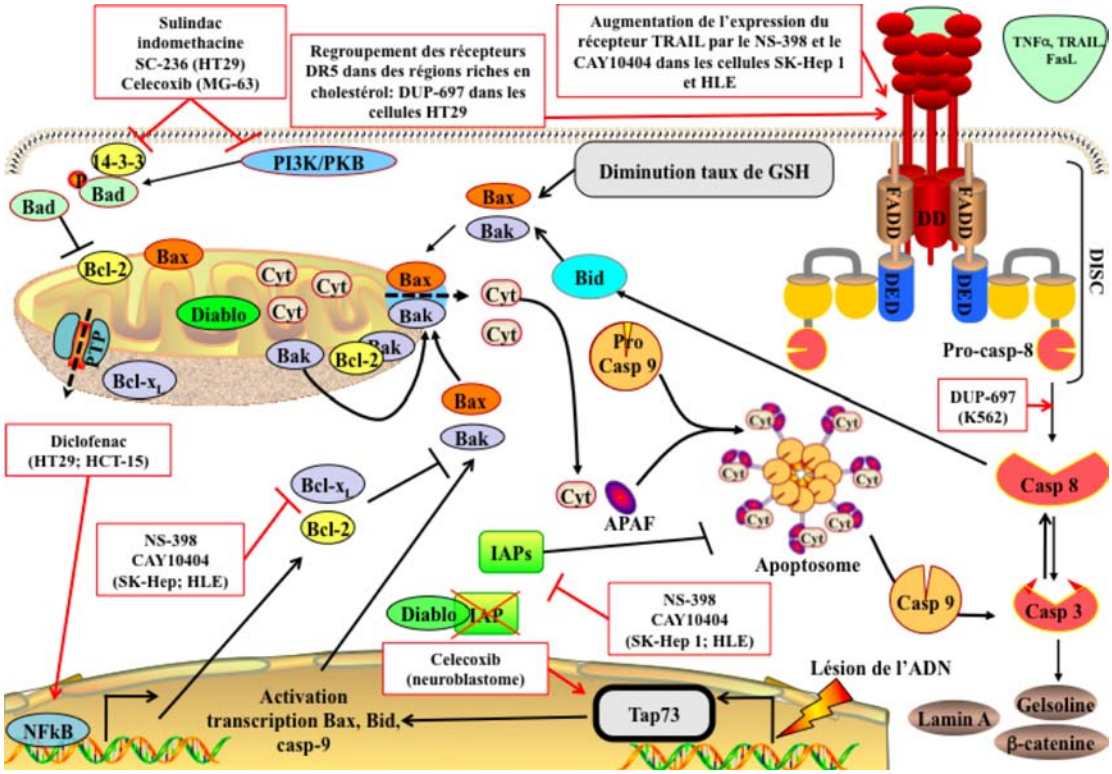


Figure 17 : Actions inhibitrices des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose intrinsèque et extrinsèque.

(D'après Sobolewski et al., 2010 avec modifications)

Les inhibiteurs de COX-2 sont capables de moduler les deux voies apoptotiques (extrinsèque et intrinsèque) dans différents types cellulaires. Cette figure représente quelques exemples d'interactions décrits dans le texte. LNCaP, prostate cancer; K562, leucémie myéloïde chronique; HT29, cancer colorectal; SK-Hep 1 and HLE, cellules d'hepatocarcinome; HepG2, hepatocarcinome ; Be17402, cellules d'hepatocarcinome ; SMMC-7402, hepatocarcinome; MG-63, ostéosarcome. AIF: apoptosis inducing factor; Bcl-2, B cell lymphoma 2 ; Bid, Bcl-2 interacting domain; Casp, caspase; Cyt, cytochrome c; DD, death domain; DED, Death effector domain; DISC, death inducing silencing complex; PI3K/PKB, phosphatidyl inositol-3 kinase/protein kinase B; FADD, Fas associated death domain; GSH, glutathione; PTP, pore de transition de perméabilité; TNF, tumor necrosis factor; TRAIL, TNF-related-inducing-apoptosis-ligand.factor) et du TCF (T-cell factor). Ces deux facteurs jouent un rôle dans la prolifération cellulaire (Grossmann 2002).

1.4.1 Les agents chimiothérapeutiques

Les agents chimiothérapeutiques sont nombreux et agissent à différents niveaux pour empêcher la prolifération des cellules tumorales (Shapiro *et al.* 1999; Chabner *et al.* 2005) ou pour les éliminer par apoptose.

Les agents chimiothérapeutiques comprennent les inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques (Tableau 3). Dans ce groupe, il y a les antimétabolites, une classe de médicaments utilisés en chimiothérapie et qui ont la propriété d'empêcher les cellules de fabriquer de nouveaux chromosomes et donc de se diviser. Ce groupe comporte aussi les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase, une enzyme responsable de la formation de désoxyribonucléotides à partir de ribonucléotides, mais aussi les inhibiteurs d'ADN topoisomérases qui sont des enzymes assurant la spiralisation/déspiralisation de l'ADN au moment de la réplication. Les inhibiteurs de topoisomérases agissent en inhibant la phase de ligation après coupure de l'ADN.

Les substances qui réagissant avec l'ADN (Tableau 3) comportent les agents intercalants. Ces molécules ont plusieurs noyaux aromatiques provoquant une déformation de la molécule d'ADN et donc une inhibition de la progression des ADN et ARN polymérases (inhibition de la réplication et de la transcription). Les agents alkylants font aussi partie de ce groupe et remplacent un proton par un radical « alkyle » (réaction électrophile), ce qui empêche les brins d'ADN de se séparer pendant la réplication.

Enfin, il y a les agents scindants qui se comportent comme des endonucléases, induisant ainsi des cassures de l'ADN comme la bléomycine par exemple (Espinosa *et al.* 2003).

Les substances interagissant avec les protéines du cytosquelette (Tableau 3), comme la tubuline, une protéine composant les microtubules (alcaloïdes de la pervenche). Les microtubules sont des structures protéiques essentielles pour la mitose. Les microtubules constituent le fuseau mitotique qui permet la séparation et la migration des chromatides de chaque chromosome lors de la mitose (Espinosa, Zamora et al. 2003).

Les petites molécules inhibitrices de tyrosine kinase (Tableau 3) inhibent l'activité tyrosine kinase des récepteurs de l'EGF (EGFR ou appelé aussi Erb pour « Erythroblastic leukemia viral oncogene ») en inhibant la phosphorylation du récepteur nécessaire à la transduction du signal. Cette inhibition peut concerner un seul récepteur, deux récepteurs ou les quatre récepteurs (Espinosa, Zamora et al. 2003) et conduit à une diminution de la prolifération cellulaire.

Tableau 3 : Classification simplifiée de quelques agents chimiothérapeutiques

Ci-dessous, un tableau réunissant plusieurs types d'agents chimiothérapeutiques. Les données proviennent du « National Cancer Institute » (http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/).

Inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques	Anti-métabolites	Analogues de purines	6-mercaptopurine Pentostatine
		Analogues de pyrimidines	5-fluorouracile
	Inhibiteurs de la dihydrofolate réductase	Analogues de l'acide folique	Méthotrexate
		Autres	Hydroxycarbamide
	Inhibiteurs de topoisomérases	Topoisomérase-I	Irinotécan Topotécan
		Topoisomérase-II	Étoposide
Substances réagissant avec l'ADN	Agents intercalants	Anthracyclines	Doxorubicine Daunorubicine Epirubicine
		Anthracènediones	Mitoxantrone
	Agents alkylants	Bifonctionnels	Cyclophosphamide
		Nitrosourées	Bendamustine
		Alkylsulfonates	Busulphan
Substances agissant sur le cytosquelette	Alcaloïdes de la pervenche	Vinblastine, Vincristine, Taxanes (paclitaxel, docétaxel)	
Autres	Inhibiteurs de tyrosine kinases	Gefitinib, Lapatinib Ditosylate, Imatinib	
	Anticorps monoclonaux	Rituximab, Trastuzumab, Bévacizumab	

Les anticorps monoclonaux (immunothérapie) (Tableau 3), comme le rituximab (anti-CD20), le cetuximab (anti-HER) ou encore le trastuzumab (anti-HER-2) (Espinosa, Zamora et al. 2003) permettent de cibler spécifiquement des récepteurs impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses, comme par exemple les récepteurs CD20, ou ceux de la famille EGFR.

La chimiothérapie constitue le traitement de « première ligne » des leucémies. Plusieurs molécules sont utilisées pour traiter ces maladies. L'imatinib, qui est connu sous le nom de « GLIVEC® », est par exemple utilisé dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique. L'adriamycine, le cyclophosphamide, la bléomycine sont utilisés pour traiter les lymphomes. La chimiothérapie s'accompagne de nombreux effets secondaires à cause du manque de spécificité contre les cellules cancéreuses des agents utilisés. Ces effets secondaires consistent en des problèmes de fertilité, une perte des cheveux (alopécie) par exemple, d'où l'intérêt de chercher d'autres traitements ou de combiner ces traitements avec d'autres molécules afin de potentialiser les effets bénéfiques et réduire les effets néfastes.

1.4.2 Chimiothérapie et chimiorésistance

La chimiothérapie peut s'avérer inefficace avec le développement de cellules résistantes. La chimiorésistance a été définie par Goldin en 1989 (Goldin *et al*., 1989 ; Cazin *et al*., 1992) comme « un échec dans l'obtention ou le maintien d'une réponse thérapeutique ». La chimiorésistance peut être immédiate (résistance primaire ou innée) ou apparaître progressivement avec l'exposition aux agents chimiothérapeutiques (résistance acquise, ou secondaire). Les mécanismes de chimiorésistances sont très variés et très étudiés (Cazin *et al*., 1992).

Il peut s'agir de surexpression de protéines impliquées dans l'import ou l'export de substances. C'est notamment le cas de glycoprotéines de la famille ABC (ATP binding cassette) qui conduisent à une résistance croisée à plusieurs agents chimiothérapeutiques de structures différentes. Ces protéines fonctionnent comme des pompes qui vont permettre une diminution de la concentration intracellulaire en agents chimiothérapeutiques, *via* un système de transport actif dépendant de l'ATP. Ces transporteurs sont constitutivement exprimés dans certains tissus, comme le foie, les reins, les poumons, le côlon où ils contribuent à la détoxification des xénobiotiques. Plusieurs glycoprotéines de cette famille sont connues pour

conduire à un phénotype MDR et sont de ce fait impliquées dans l'échec thérapeutique de plusieurs types de tumeurs. Dans ce contexte, la glycoprotéine-P (perméase) (ABCB1) (Van der Bliek *et al*., 1989), les protéines MRP1-6 (multidrug resistant-associated protein) retrouvées dans les cancers du sein, BCRP (Breast cancer resistance protein) qui conduit à une chimiorésistance dans les cancers du sein (Luqmani 2005). La glycoprotéine-P, qui est la plus connue des protéines de la famille ABC conduit à une résistance aux anthracyclines, aux alcaloïdes de la pervenche, à l'étoposide, à la camptothécine, aux anthracènes (Sharom 2008).

La surexpression d'enzymes impliquées dans la détoxification conduit aussi à une chimiorésistance. La glutathion *S*-transférase (GST) permet par exemple de conjuguer divers composés électrophiles avec le GSH. La réaction permet de rendre les xénobiotiques plus hydrosolubles, permettant une meilleure excrétion (Gresner *et al.* 2007). D'une manière similaire, la famille des cytochromes P450 permet la détoxification des cellules en réalisant une oxydation du xénobiotiques qui conduit à leur dégradation. (Grant *et al.* 1995)

Les altérations quantitative et/ou qualitative de la cible conduisent aussi à un phénotype résistant. Dans ce cas, l'agent chimiothérapeutique est soit incapable de reconnaître sa cible, soit en quantité insuffisante pour inhiber la totalité de la cible (*par exemple,* amplification du gène codant la dihydrofolate réductase (Schimke *et al*., 1984) et la thymidylate synthase (Clark *et al*., 1987), des cibles du méthotrexate et du 5-fluoro-uracile (5-FU) (Goker *et al*., 1998).

La chimiorésistance peut aussi être la conséquence d'une diminution de la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose. Une surexpression de protéines anti-apoptotiques, comme par exemple la protéine Bcl-2, peut conduire à une diminution de l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques (Kitagawa, Wong et al. 1996; Ciardiello and Tortora 2002). Par ailleurs, la diminution de l'expression de facteurs pro-apoptotiques peut aussi être observée comme par exemple une diminution de l'expression de Bax dans le cancer du côlon. (Rampino, Yamamoto et al. 1997).

Une augmentation de la réparation des lésions peut aussi conduire à une chimiorésistance. C'est par exemple le cas lors de l'induction de l'expression d'enzymes impliquées dans la réparation des altérations causés par l'agent chimiothérapeutique (*par exemple,* PARP) (D'Andrea 2010).

Plus récemment, l'autophagie a été associée à la chimiorésistance des cellules tumorale. L'autophagie est un processus caractérisé par la destruction des constituants intracellulaires par les cellules (*par exemple,* des protéines ou des organites). Ce mécanisme permet le « recyclage » des protéines en assurant la dégradation des protéines endommagées.

Ce processus est induit dans des conditions de stress comme la privation de facteurs de croissance afin d'empêcher la mort cellulaire. L'autophagie commence par la formation de vacuoles appelées « autophagosomes » qui capturent des parties du cytoplasme, des organites (*par exemple*, les mitochondries). Ces vacuoles fusionnent ensuite avec des lysosomes formant ainsi des autophagolysosomes. Cette étape s'accompagne de la dégradation du contenu des autophagolysosomes par le biais des enzymes lysosomiales (*par exemple*, les cathepsines). L'autophagie correspond ainsi à une voie métabolique qui permet la survie des cellules tumorales. Cependant si ce processus est exacerbé, il peut aussi conduire à la mort cellulaire par apoptose. L'autophagie, avec l'apoptose, contribuent à l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules endommagées (mort cellulaire de type II) (Maiuri *et al.* 2007). Par conséquent, une dérégulation de l'autophagie caractérise la plupart des cancers (Maiuri, Zalckvar et al. 2007). Les relations entre l'apoptose et l'autophagie sont actuellement peu connues car dans certains cas, l'autophagie permet une adaptation des cellules au stress comme la privation de facteurs de croissance, ce qui conduit à une inhibition de l'apoptose. Dans d'autres cas, l'autophagie peut induire l'apoptose (Maiuri, Zalckvar et al. 2007). Par ailleurs, des stimuli similaires peuvent induire l'apoptose et l'autophagie (Maiuri, Zalckvar et al. 2007). Le fait que COX-2 module l'apoptose et qu'il existe des liens entre l'apoptose et l'autophagie suggère que COX-2 peut jouer un rôle dans l'autophagie. Cependant, peu d'études sur le lien entre COX-2 et ce processus ont été publiées. Une étude a montré que le sulfure de sulindac (AINS) induit l'apoptose des cellules HT-29. Cet effet est augmenté par le traitement des cellules avec de la 3-méthyladénine, un inhibiteur de l'autophagie (Bauvy *et al.* 2001). Ces résultats suggèrent donc que l'autophagie inhibe l'apoptose induite par le sulfure de sulindac.

1.4.3 Les inhibiteurs de COX-2 en combinaison avec la chimiothérapie

Les inhibiteurs de COX-2 ont révélé une capacité à sensibiliser les cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques dans plusieurs modèles mais aussi dans des essais cliniques. Le cancer colorectal est particulièrement concerné par la chimiorésistance. Une étude a révélé que le naproxène et l'indométacine sont capables d'inhiber l'expression et l'activité de la glycoprotéine-P dans la lignée CACO-2 (lignée de cancer colorectal) (Zrieki, Farinotti et al. 2008). Une autre étude a montré que le méloxicam inhibe l'expression de cette même protéine dans les cellules HL60 (leucémie humaine à promyélocyte) et des cellules leucémiques de

patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (Puhlmann *et al.* 2005). D'autres travaux ont mis en évidence une diminution de l'expression de MDR1 par des inhibiteurs de COX-2 comme par exemple le célécoxib qui inhibe l'induction de MDR1 par la doxorubicine dans les cellules MCF-7 (lignée de cancer du sein œstrogène dépendante) (Chen *et al.* 2011).
La combinaison des inhibiteurs de COX-2 avec les agents chimiothérapeutiques a été étudiée par Liu *et al* . Les auteurs ont montré que le célécoxib augmente la sensibilité des cellules MG-63 (ostéosarcome) au cisplatine en diminuant l'expression des protéines anti-apoptotiques comme la survivine et Bcl-2 et en inhibant la voie de survie PI3K/Akt (qui phosphoryle la protéine pro-apoptotique Bad et entraîne alors sa séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3). Il a aussi été démontré que la combinaison du NS-398 et du chlorambucile, un agent alkylant, permet d'augmenter l'apoptose des cellules de LLC-B (leucémie lymphoïde chronique à cellules B) provenant de patients (Secchiero, Barbarotto et al. 2005). Le NS-398 est aussi capable d'augmenter l'effet cytotoxique de la gemcitabine, un antimétabolite analogue de la 2'-désoxycytidine, sur les cellules A549ACA (lignée d'adénocarcinome du poumon) en activant l'apoptose (Chen *et al.* 2008). D'autre part, la combinaison conduit à une inhibition de la prolifération cellulaire avec une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire et une augmentation de l'expression de p21 (Chen, Xiao et al. 2008).

Toutes ces données suggèrent que les inhibiteurs de COX-2 peuvent sensibiliser différents types de cellules tumorales à plusieurs agents chimiothérapeutiques. Ces données montrent que les inhibiteurs de COX-2 sont des molécules prometteuses en cancérologie, notamment pour les cellules ayant acquit un phénotype MDR. Plusieurs essais cliniques déjà ont été réalisés. Ainsi, le célécoxib est en étude clinique de phase II en combinaison avec le paclitaxel, le carboplatine et la radiothérapie sur des patients avec des cancers du poumon non à petites cellules (Mutter *et al.* 2009).

2 Objectifs

2.1 Hypothèse générale de travail

Le lien entre COX-2 et le développement de cancers est aujourd'hui connu. Ce lien est notamment connu pour les tumeurs dites « solides » (*par exemple*, le cancer du sein ou du côlon). Cependant, il y aurait aussi un rôle de COX-2 dans la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules cancéreuses provenant de leucémies et de lymphomes. Les inhibiteurs de COX-2 pourraient donc avoir des effets bénéfiques en thérapie anti-cancéreuse. Quels sont les mécanismes d'action des inhibiteurs de COX-2 sur le cycle cellulaire et l'apoptose ? Notre projet a pour but de répondre à cette question et particulièrement sur plusieurs modèles d'hémopathies (les lignées cellulaires Hel, Jurkat, K562, Raji et U937).

2.2 Objectifs spécifiques

1- La première partie de ce projet consistera à étudier l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération et le cycle cellulaire des différentes lignées cellulaires. En effet, l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur le cycle cellulaire n'est pas encore clairement défini et surtout dans les modèles hématopoïétiques. Afin d'atteindre cet objectif, nous utiliserons trois inhibiteurs sélectifs de COX-2 qui sont le célécoxib, le nimésulide et le NS-398. Ces inhibiteurs agissent de façon différente pour inhiber COX-2. Afin de comprendre l'effet de ces molécules sur le cycle cellulaire, nous évaluerons l'expression de protéines impliquées dans la progression ou l'inhibition de celui-ci, comme les protéines p16, p21 ou p27 mais aussi la cycline D1, PCNA et c-Myc par RT-PCR en temps réel et par Western Blot. Nous déterminerons aussi si l'effet induit par les inhibiteurs de COX-2 est dépendent ou non de l'inhibition de COX-2, en étudiant la synthèse de PGE2 par exemple.

2- Les inhibiteurs de COX-2 ont démontré une capacité à sensibiliser les cellules tumorales aux chimiothérapies. Cet effet a surtout été étudié pour les tumeurs solides mais a été peu abordé pour les modèles hématopoïétiques. Notre étude consistera donc à étudier l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose induite par différents agents

chimiothérapeutiques. L'apoptose sera en premier lieu étudiée par observation de la morphologie nucléaire. Par ailleurs, l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur les mécanismes fondamentaux de l'apoptose sera aussi étudié, comme l'activation/l'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL), l'activation des caspases (*par exemple,* la caspase-3, la caspase-8, la caspase-9), la diminution du potentiel membranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c.

3- Dans la troisième partie du projet, nous essayerons de combiner les inhibiteurs de COX-2 avec des substances d'origine naturelle ayant aussi des propriétés anti-inflammatoires et antitumorales. Cette combinaison a démontré des effets bénéfiques pour des tumeurs solides avec notamment des effets additifs ou synergiques en terme d'inhibition de la prolifération cellulaire ou d'induction d'apoptose. Cependant une telle stratégie n'a jamais été étudiée pour les cancers du sang. L'étude portera particulièrement sur la curcumine, une molécule qui a déjà démontré de nombreuses propriétés anti-inflammatoires et antitumorales. Nous étudierons l'effet de cette combinaison sur la prolifération, le cycle cellulaire et l'apoptose de nos différentes lignées cellulaires

4- Enfin, nous utiliserons le 2,5 diméthyl-célécoxib (DMC), un analogue de célécoxib ne possédant pas la capacité d'inhiber l'activité de COX-2. De nombreuses études ont démontré que les effets secondaires des inhibiteurs de COX-2 étaient la conséquence de l'inhibition de l'activité de l'enzyme. Afin de voir si cet analogue possède les mêmes propriétés que le célécoxib, Nous étudierons l'effet de cette molécule sur la prolifération et l'apoptose de nos différentes lignées cellulaires.

3 Matériels et méthodes

3.1 Lignées cellulaires et traitements

3.1.1 Lignées cellulaires

- La lignée U937 a été établie à partir de cellules malignes prélevées dans l'épanchement pleural d'un homme de 37 ans atteint d'un lymphome histiocytique diffus en 1974 (Sundstrom *et al.* 1976). Ces cellules ont des propriétés de monocytes et expriment des marqueurs de cette lignée comme le récepteur au facteur C3 du complément.

- La lignée JURKAT a été établie à partir de cellules périphériques d'un patient de 14 ans atteint d'une leucémie aiguë à cellules T (Schneider *et al.* 1977).

- La lignée Raji a été établie à partir de cellules provenant de la glande maxillaire d'un patient africain de 11 ans atteint d'un lymphome de Burkitt en 1963 (Pulvertaft 1974).

- La lignée K562 est une lignée continue établie à partir des cellules d'une leucémie myéloïde chronique en phase blastique terminale, prélevée dans le liquide pleural d'une patiente de 53 ans (Lozzio and Lozzio 1975). Il s'agit de cellules indifférenciées, capables de s'orienter vers l'une des trois lignées circulantes : érythroïde, granulocytaire, monocytaire. Les K562 se caractérisent par le chromosome de Philadelphie qui résulte de la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. Au cours de cette translocation, le protooncogène c-Abl normalement présent sur le chromosome 9 fusionne avec le gène BCR (break point cluster region) situé sur le chromosome 22 (Woessmann *et al.* 2001). Le gène hybride qui résulte de cette translocation conduit à la synthèse d'une protéine de fusion BCR-ABL à activité tyrosine kinase constitutive (McGahon, Bissonnette et al. 1994).

- La lignée Hel est une lignée qui a été établie à partir du sang périphérique d'un homme âgé de 30 ans atteint d'une érythroleucémie (Martin *et al.* 1982). Ce sont des cellules leucémiques qui expriment différents phénotypes mégacaryocytaires.

Les lignées cellulaires proviennent de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Allemagne). La culture cellulaire de ces différentes lignées a été effectuée dans du milieu RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgique) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgique) ainsi que de 1 %

d'un mélange d'antibiotiques et antimycotiques (pénicilline, streptomycine) (Lonza) sous une atmosphère de 5% CO2, à 37°C.

3.1.2 Traitements

Les cellules ont subi différents traitements durant ce projet. Les différentes substances utilisées sont récapitulées dans le tableau 4. Pour les traitements, les cellules ont été ensemencées à une concentration allant de 200000 à 500000 cellules/mL. L'effet des traitements a été comparé aux échantillons contrôles, c'est à dire traités par le solvant seul (DMSO).

3.2 Étude de la prolifération cellulaire

3.2.1 Coloration d'exclusion au bleu de trypan

La prolifération cellulaire a été étudiée par coloration d'exclusion au bleu de trypan. Seules les cellules mortes permettent l'entrée de ce composé car leur membrane plasmique est perméable. Ainsi les cellules vivantes, grâce à l'intégrité de leur membrane plasmique apparaissent blanches en microscopie. Les cellules blanches ont été dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez. Les résultats ont été représentés par la concentration cellulaire (nombre de cellules vivantes/mL).

3.2.2 Marquage au Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE)

Le CFSE s'accumule dans les cellules et la quantité de CFSE dans chaque cellule est divisée par deux à chaque division cellulaire. Ainsi, plus les cellules prolifèrent, plus l'intensité de fluorescence diminue.

Un million de cellules ont été lavées deux fois dans du PBS (phosphate buffered saline) (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na_2HPO_4, 1,4mM KH_2PO_4), puis resuspendues dans une solution de PBS contenant 0,1% de ASB et 0,2µM de CFSE (Sigma Aldrich). Les cellules ont alors été incubées pendant 10 min à 37°C, puis lavées deux fois dans du PBS 1X et enfin resuspendues dans du milieu de culture à une concentration de 200000 cellules/mL. Les cellules ont ensuite été traitées et la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux à

t =0, 24h et 48h de traitement.

Tableau 4 : Composés utilisés pour le traitement des différentes lignées cellulaires.

Le nom des molécules ainsi que les concentrations et les temps d'exposition, utilisés pour notre étude, sont indiqués dans le tableau suivant.

Molécules	Fournisseur	Fonction(s)	Concentrations utilisée(s)	Temps d'expositions des cellules
Actinomycine D	**Sigma Aldrich**	**Inhibiteur de transcription**	**5µg/mL**	**1h**
Camptothécine	**Sigma Aldrich**	**Inhibiteur de topoisomérase-I**	**100µM**	**24h**
Célécoxib	**Pharmacia Celebrex®**	**Inhibiteur spécifique de COX-2**	**10-40µM**	**Jusqu'à 72h**
Cisplatine	**TEVA PHARMA**	**Agent alkylant**	**100µM**	**8h-24h**
Cycloheximide	**Sigma Aldrich**	**Inhibiteur de la traduction protéique**	**10µg/mL**	**1h**
Cytarabine	**TEVA PHARMA**	**Analogue de cytosines**	**10µM**	**24h**
Doxorubicine	**Sigma Aldrich**	**Agent intercalant**	**4µM**	**8h**
Étoposide	**Sigma Aldrich**	**Inhibiteur de topoisomérase-2**	**100µM**	**5-24h**
FasL	**Millipore**	**Inducteur de l'apoptose extrinsèque**	**50ng/mL**	**16h**
Hémine	**MP-Biomedicals**	**Contrôle positif pour le test des benzidines**	**30µM**	**72h**
H_2O_2	**Sigma Aldrich**	**Inducteur de stress oxydant**	**500µM**	**1h**
Il-1β	**Pepro Tech**	**Cytokine pro-inflammatoire**	**10-50ng/mL**	**24h**

Molécules	Fournisseur	Fonction(s)	Concentrations utilisée(s)	Temps d'expositions des cellules
Irinotécan	**Pfizer**	**Inhibiteur de topoisomérase-I**	**10µM**	**24h**
Méthotrexate	**TEVA PHARMA**	**Antimétabolite**	**2mM**	**24h**
Nimésulide	**Cayman Chemical**	**Inhibiteur préférentiel de COX-2**	**10-100µM**	**Jusqu'à 72h**
NS-398	**Cayman Chemical**	**Inhibiteur préférentiel de COX-2**	**10-100µM**	**Jusqu'à 72h**
PD98059	**Promega**	**Inhibiteur spécifique de ERK1/2**	**25µM**	**1h**
Phorbol 12-myristate-13 acétate (PMA)	**Sigma Aldrich**	**Promoteur tumoral**	**160nM**	**24h**
Prostaglandine E2	**Sigma Aldrich**	**Eicosanoïde dérivé de l'acide arachidonique**	**1pM-100nM**	**1h**
SB203580	**Promega**	**Inhibiteur spécifique de p38MAPK**	**25µM**	**1h**
TNFα	**Pepro Tech**	**Inducteur de l'apoptose extrinsèque**	**20ng/mL**	**8h-24h**
TRAIL	**Millipore**	**Cytokine se fixant sur les récepteurs TRAIL-R (apoptose extrinsèque)**	**5ng/mL**	**8h**

Le CFSE est excité à 492 nm et émet à 517 nm. L'analyse par cytométrie a été réalisée pour 10000 événements/échantillon à l'aide du logiciel CellQuest. Les données récoltées ont été analysées à l'aide du logiciel Flow-Jo.8.8.5.

3.2.3 Mesure de l'index mitotique par coloration de May Grünwald GIEMSA

La prolifération cellulaire a été étudiée par estimation de l'index mitotique (Hoffman 1949), c'est-à-dire le pourcentage de cellules en mitose, comprenant les cellules en prophase, métaphase, anaphase et cytodiérèse. Les cellules mitotiques ont été mises en évidence par morphologie cellulaire après une coloration de May-Grünwald-Giemsa. Il s'agit d'une méthode de coloration très utilisée en hématologie pour analyser et caractériser les cellules du sang. Elle repose sur l'action de deux colorants neutres. Le premier, le May Grünwald, qui contient de l'éosine, un colorant acide permettant de colorer le cytoplasme, et du bleu de méthylène, un colorant basique, qui va permettre de colorer le noyau et les granulations cytoplasmiques basophiles. Le second, le GIEMSA contient de l'éosine, du bleu de méthylène et de l'azur de méthylène, un colorant basique. Les colorants acides permettent de colorer les résidus basiques (ADN, cytoplasme des lymphocytes) et on parle alors de « basophilie ». À l'inverse, les colorants basiques colorent les éléments acides. Ces éléments seront qualifiés de « acidophile » ou « éosinophile » comme le cytoplasme des hématies par exemple.
Ces deux colorants sont solubilisés dans de l'alcool méthylique dans lequel ils sont inactifs. C'est le contact avec l'eau qui permet d'activer les colorants. En effet, les sels se dissocient alors en colorant acide (éosine) et basique (bleu et azur de méthylène). Par ailleurs, ce type de coloration permet de révéler toutes les étapes de la mitose (Sideris *et al.* 1984).
La morphologie des cellules peut varier en cas de différenciation cellulaire, de sénescence, d'autophagie, d'apoptose ou de nécrose. La morphologie des cellules peut aussi être observée par ce protocole.

Cent mille cellules ont été déposées sur une lame qui a ensuite été centrifugée par « cytofuge » (StatSpin, Aartselaar, Belgique). Les lames ont ensuite été plongées dans une solution de May-Grünwald (Merck, Leuven, Belgium) pendant 5 minutes puis dans une solution de May-Grünwald diluée au 1/4 dans de l'eau distillée pendant 2 minutes. Enfin, les lames ont été immergées dans du colorant GIEMSA (Merck) dilué au 1/20 dans de l'eau distillée pendant 15 min, puis rincées à l'eau distillée et séchées avant d'être observées par microscopie photonique classique.

3.3 Etude du cycle cellulaire

3.3.1 Marquage à l'iodure de propidium

Le cycle cellulaire a été étudié par cytométrie en flux. Un million de cellules de chaque échantillon ont été prélevées et lavées au PBS (centrifugation à 350g). Le culot a ensuite été resuspendu dans 500 µL d'éthanol à 70 % à 4°C afin de fixer les cellules. Puis les échantillons ont été placés à 4 °C pendant 30 minutes puis lavés deux fois au PBS 1X (centrifugation à 280g) et resuspendus dans 500 µL d'une solution de PBS contenant de la RNase (100 µg/mL) (Sigma Aldrich) et de l'iodure de propidium (1 µg/mL) (Sigma Aldrich). Les échantillons ont ensuite été analysés par cytométrie en flux en utilisant le capteur FL2. L'analyse par cytométrie a été réalisée pour 10000 événements/échantillon à l'aide du logiciel CellQuest. Les données récoltées ont été analysées à l'aide du logiciel Flow-Jo.8.8.5.

3.3.2 Marquage pour l'antigène nucléaire Ki-67

L'antigène nucléaire Ki-67 est une protéine de 360 kDa exprimée par les cellules qui prolifèrent (Schluter *et al.* 1993). Ki-67 n'est pas exprimé dans les cellules en phase G0 du cycle cellulaire (Schluter, Duchrow et al. 1993). Le marquage de Ki-67 a été réalisé à l'aide du kit cytofix/cytoperm de BD Biosciences, comme décrit précédemment. Pour le marquage, l'anticorps primaire a été utilisé à la dilution de 1/80, pendant 1h à température ambiante. Pour l'anticorps secondaire couplé à la FITC, la dilution est de 1/50. Le marquage a été observé par microscopie à fluorescence et quantifié par cytométrie en flux. Les données récoltées ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Flow-Jo.8.8.5.

3.4 Extractions de protéines totales

Les protéines totales ont été extraites à partir de dix millions de cellules. Les cellules sont d'abord lavées au PBS deux fois puis lysées avec une solution M-PER® (Mammalian Protein Extraction Reagent) (ThermoFisher, Erembodegem, Belgique) mélangée à un cocktail d'inhibiteurs de protéases ainsi qu'avec un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases selon les instructions du fournisseur (Roche, Luxembourg, Luxembourg). Après l'ajout de la solution

de lyse, les cellules ont été placées à 4°C sous agitation (Vortex) pendant quinze minutes puis les échantillons ont été centrifugés à 4°C à 15000g pendant 15 minutes. Le surnageant résultant de cette centrifugation contenant les extraits protéiques totaux a été récupéré. Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford 1976).

Pour l'étude de la stabilité des protéines, les cellules ont été traitées par le cycloheximide, un antibiotique qui bloque la synthèse protéique (Siegel *et al.* 1963). Dans notre étude, les cellules ont été traitées à la concentration finale de 10µg/mL pendant 5, 10, 20, 40 et 60 minutes.

3.5 Analyse de l'expression des protéines par Western Blot

Le Western Blot (ou immunoblot) est une technique qui permet de déterminer le niveau d'expression des protéines dans les cellules. Les protéines sont identifiées selon leur poids moléculaire. La séparation des protéines selon leur poids moléculaire se fait par électrophorèse. L'électrophorèse est la migration de particules chargées placées sous l'influence d'un champ électrique à travers un gel de polyacrylamide en présence de Sodium DodécylSulfate (SDS). Il s'agit alors de SDS-PAGE (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

Les quantités de protéines comprises entre 5 et 40 µg ont été mélangé à un même volume de tampon de chargement, (5% de 2-Mercaptoéthanol p/v, 20% de glycérol p/v, 4% de SDS p/v et 0,005% de bleu de bromophénol p/v). Le β-mercaptoéthanol sert à dénaturer les structures secondaires des protéines. Le glycérol facilite le dépôt des protéines. Le bleu de bromophénol permet de suivre l'évolution de la migration. La dernière étape de préparation des échantillons consiste à ajouter du SDS (permettant de charger les protéines négativement) et de faire chauffer les échantillons (100°C). La température d'échauffement pour l'étude de la protéine PARP est de 80°C. Les échantillons ont ensuite été refroidis rapidement à 4 °C. Les échantillons ont été déposés dans le gel de concentration (4% acrylamide) pour migration. L'électrophorèse a été réalisée dans du tampon d'électrophorèse (25mM Tris, 192mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3). L'isotachophorèse se fait à 10 mA /gel pendant 20 min et la migration à 20 mA/gel pendant 1h. Après migration, il s'agit de transférer les protéines sur une membrane de polyVinylidineDiFluoride (PVDF) (GE Healthcare, Pays-Bas). Cette étape nécessite au préalable l'activation de la membrane par un bain de méthanol pendant 30 secondes suivis d'un rinçage à l'eau distillée. Puis les membranes ont été placées dans du

tampon de transfert (2,5mM Tris, 0,2M glycine, 20% méthanol v/v) pendant 15 min sous agitation.

Après le transfert, les membranes de PVDF ont été incubées pendant 1h à température ambiante sous agitation dans une solution de lait/PBS-TWEEN à 5% (m/v) ou dans une solution de ASB (albumine sérique bovine)/PBS TWEEN 5% (m/v) (en fonction de la protéine étudiée). Les membranes ont ensuite été incubées dans une solution de lait ou de ASB/PBS-TWEEN 5% contenant l'anticorps primaire d'intérêt. Les temps d'incubation, ainsi que les dilutions d'anticorps utilisées ont été récapitulés dans le tableau 5. Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire pendant 1h possédant une peroxydase (horseradish peroxidase, HRP), puis incubées dans une solution de substrat (GE Healthcare, Pays-Bas) dont le produit, obtenu par l'enzyme couplée à l'anticorps secondaire, est luminescent. Il s'agit donc là d'une réaction de chimiluminescence. Les signaux lumineux ont été recueillis sur un film d'autoradiographie (Hyperfilm™, GE Healthcare).

3.6 Analyse de l'expression de gènes au niveau de l'ARNm par RT-PCR

3.6.1 Extraction et purification des ARNm

Dix millions de cellules ont été lysées à l'aide d'une solution de TRIzol® (Invitrogen). Le lysat a été homogénéisé et placé 5 min à 22°C. Puis, 0,2 mL de chloroforme ont été ajoutés au lysat. Le mélange a ensuite été agité pendant 15 secondes et incubé à température ambiante pendant 3 min. Après centrifugation des échantillons pendant 15 min à 12000g à 4°C, la phase aqueuse a été récupérée et placée dans un autre tube.

La seconde étape de ce protocole consiste à précipiter l'ARNm. L'isopropanol permet cette précipitation (0,5 mL sont ajoutés à la phase aqueuse). Le mélange a été agité vigoureusement puis incubé pendant 10 min à température ambiante. Puis, les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min à 12000g à 4°C. Le surnageant a été retiré et le culot d'ARN (culot blanc) a été lavé avec 1mL d'éthanol à 80% (v/v). Il est important lors de cette étape de resuspendre le culot d'ARN de manière modérée. Pour effectuer ce lavage, les échantillons ont été centrifugés à 7500g pendant 3 min à 4°C.

Le culot a été séché pendant 5 min à température ambiante. Puis le culot d'ARN a été dissout dans 100µL d'eau DEPC (Diéthyl pyrocarbonate). Le DEPC permet d'inhiber les ARNases (Ribonucléases) qui dégradent les ARNs.

Tableau 5 : Anticorps primaires utilisés pour les expériences de Western Blot

Anticorps primaire	Fournisseur	Blocage membrane	Origine	Dilution	Protéines (µg)	Temps d'incubation avec la membrane	Dilution anticorps secondaire
Actine β 41kDa	Sigma	Lait-PBST 5%	Souris	1/20000 Lait PBST 5%	5-40µg	1h à température ambiante	1/20000 Lait PBST 5%
Bcl-2 41kDa	Calbiochem	1h/Lait-PBST 5%	Souris	1/2000 Lait PBST 5%	20µg	ON 4°C	1/5000
Bcl-xL 41kDa	Santa Cruz Biotechnology	1h/Lait-PBST 5%	Souris	1/5000 Lait PBST 5%	20µg	ON 4°C	1/2000
Caspase-3 41kDa	Cell Signaling Technology	1h/Lait-PBST 5%	Souris	1/1000 Lait PBST 5%	20µg	ON 4°C	1/2000 Lait PBST 5%
Caspase-8 41kDa	Cell Signaling Technology	1h/Lait-PBST 5%	Souris	1/1000 Lait PBST 5%	20µg	ON 4°C	1/2000 Lait PBST 5%
Caspase-9 41kDa	Cell Signaling Technology	1h/Lait-PBST 5%	Lapin	1/1000 Lait PBST 5%	20µg	ON 4°C	1/5000 Lait PBST 5%
c-Myc 41kDa	BD Biosciences Pharmingen	1h/Lait-PBST 5%	Souris	1/250 Lait PBST 5%	20-40µg	ON 4°C	1/5000 Lait PBST 5%
Phospho-c-Jun 41kDa	Santa Cruz Biotechnology	1h/Lait-PBST 5%	Lapin	1/500 ASB PBST 5%	20µg	ON 4°C	1/1000 Lait PBST 5%
c-Jun 41kDa	Santa Cruz Biotechnology	1h/Lait-PBST 5%	Lapin	1/500 ASB PBST 5%	20µg	ON 4°C	1/1000 Lait PBST 5%
COX-1 41kDa	Santa Cruz Biotechnology	1h/Lait-PBST 5%	Chèvre	1/1000 Lait PBST 5%	20µg	ON 4°C	1/5000 Lait PBST 5%
COX-2 41kDa	Santa Cruz Biotechnology	1h/Lait-PBST 5%	Chèvre	1/1000 Lait PBST	20µg	ON 4°C	1/2000 Lait PBST 5%
cycline D1 41kDa	Millipore	1h/Lait-PBST 5%	Souris	1/1000 Lait PBST 5%	10µg	ON 4°C	1/4000 Lait PBST 5%
Phospho-ERK1/2 41kDa	Cell Signaling Technology	1h/ASB-PBST 5%	Lapin	1/1000 ASB PBST 5%	40µg	ON 4°C	1/2000 Lait PBST 5%
ERK1/2 41kDa	Cell Signaling Technology	1h/ASB-PBST 5%	Lapin	1/1000 ASB PBST 5%	40µg	ON 4°C	1/2000 Lait PBST 5%

GSTP1 41kDa	**BD Biosciences Pharmingen**	**1h / Lait PBST 5%**	**Souris**	**1/25000 Lait PBST 5%**	**2,5-10µg**	**2h à température ambiante**	**1/50000 PBST**
Phospho-JNK 41kDa	**Cell Signaling Technology**	**2h / Lait PBST 5%**	**Lapin**	**1/1000 ASB PBST 2,5%**	**40µg**	**ON 4°C**	**1/4000 Lait PBST 5%**
JNK 41kDa	**Santa Cruz Biotechnology**	**ON/lait PBST 5%**	**Lapin**	**1/1000 Lait PBST 5%**	**40µg**	**1h à température ambiante**	**1/4000 Lait PBST 5%**
Phospho-mTOR	**Cell Signaling Technology**	**1h/ASB-PBST 5%**	**Lapin**	**1/1000 ASB PBST 5%**	**40µg**	**ON 4°C**	**1/2000 Lait PBST 5%**
mTOR	**Cell Signaling Technology**	**1h/ASB-PBST 5%**	**Lapin**	**1/1000 ASB PBST 5%**	**40µg**	**ON 4°C**	**1/2000 Lait PBST 5%**
PARP 41kDa	**BD Pharmingen**	**ON/lait PBST 5%**	**Souris**	**1/2000 Lait PBST 5%**	**20µg**	**ON 4°C**	**1/4000 Lait PBST 5%**
p16 41kDa	**Santa Cruz Biotechnology**	**1h/Lait-PBST 5%**	**Lapin**	**1/1000 Lait PBST 5%**	**40µg**	**ON 4°C**	**1/4000 Lait PBST 5%**
p27 41kDa	**Santa Cruz Biotechnology**	**1h/Lait-PBST 5%**	**Lapin**	**1/1000 Lait PBST 5%**	**40µg**	**ON 4°C**	**1/4000 Lait PBST 5%**
Phospho-p38MAPK 41kDa	**Cell Signaling Technology**	**1h/ASB-PBST 5%**	**Lapin**	**1/2000 ASB PBST 5%**	**40µg**	**ON 4°C**	**1/4000 Lait PBST 5%**
p38MAPK 41kDa	**Cell Signaling Technology**	**1h/ASB-PBST 5%**	**Lapin**	**1/2000 ASB PBST 5%**	**40µg**	**ON 4°C**	**1/5000 Lait PBST 5%**
p53 41kDa	**Santa Cruz Biotechnology**	**1h/Lait-PBST 5%**	**Souris**	**1/1000 Lait PBST 5%**	**40µg**	**ON 4°C**	**1/2000 Lait PBST 5%**
p73 41kDa	**Santa Cruz Biotechnology**	**1h/Lait-PBST 5%**	**Souris**	**1/1000 Lait PBST 5%**	**40µg**	**ON 4°C**	**1/2000 Lait PBST 5%**
PCNA 41kDa	**Santa Cruz Biotechnology**	**1h/Lait-PBST 5%**	**Lapin**	**1/30000 Lait PBST 5%**	**5µg**	**ON 4°C**	**1/30000 Lait PBST 5%**
XIAP 41kDa	**BD Pharmingen**	**1h/Lait-PBST 5%**	**Souris**	**1/1000 Lait PBST 5%**	**20µg**	**ON 4°C**	**1/5000 Lait PBST 5%**

Les ARNs ont été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop afin de vérifier leur pureté. Les ARNs ont ensuite été dilués dans de l'eau DEPC de manière à obtenir une concentration comprise entre 50 et 400 ng/µL. L'intégrité des ARNs a été vérifiée à l'aide du système «Agilent Bioanalyzer 2100» (Agilent Technologies, Diegem, Belgique). Cette électrophorèse capillaire permet de vérifier l'intégrité de l'ARN par mesure de la densité optique pendant la migration des ARNs sur une matrice (gel du kit Bioanalysor 2100). Les échantillons d'ARN ont été conservés à -80°C.

Pour l'étude de la stabilité des ARNs, les cellules ont été traitées par l'actinomycine D (ou dactinomycine), un antibiotique qui bloque la transcription (Sigma Aldrich) à la concentration finale de 5µg/mL pendant 20, 40 et 60 minutes pour la lignée U937.

3.6.2 ***Transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)***

3.6.2.1 Transcription inverse

La transcription inverse (RT) est une procédure qui permet d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN totaux extraits avec le TRIzol®

Un mélange contenant 10µg d'ARN totaux et 5µg d'amorce oligo(dT) dans un volume de 11,75µL a été dénaturé pendant 10 minutes à 70°C. Le mélange a ensuite été refroidi à 4°C puis a été additionné de 8,25µL d'une solution contenant 4µL de tampon de RT 5X (Invitrogen), 1µL de dNTP (10mM chaque NTP), 2µL de DTT (0,1M), 50 unités de Superscript II RT (200U/µL) et 1µL d'inhibiteurs de RNase (RNAsin, 40U/µL, Invitrogen).

Les échantillons ont ensuite été placés dans le thermocycleur pour une incubation à 42°C pendant 2h. C'est pendant cette étape que la synthèse d'ADNc est réalisée à partir des ARNs. Une incubation de 15 minutes à 70°C a ensuite été réalisée afin de dénaturer la Superscript II et ainsi d'arrêter la réaction. Les ARNs ayant servi de matrice ont ensuite été dégradés par une incubation de 20 minutes à 37°C en présence de RNase H (40U/µL, Invitrogen).

3.6.2.2 Protocole de transcription inverse pour les microARNs

La transcription inverse des miRs a été réalisée à l'aide du kit « miScript PCR System » (Quiagen) à partir des ARNs extraits avec le TRIzol®. Les miRs ne contiennent pas de séquence polyA. Par conséquent, une solution contenant une PolyA-polymérase a été utilisée (miScript Reverse Transcriptase mix). Les miRs polyadénylés ont ensuite été convertis en ADNc à l'aide d'amorces aléatoires, d'oligo-dT couplées à une séquence « tag » universelle et de la transcriptase inverse présente aussi dans la solution. Pour ce protocole, 1µg d'ARN total a été utilisé. Les ARNs ont été incubés pendant 60 min à 37°C dans le mix de transcription inverse, puis pendant 5 min à 95°C pour inhiber la RT.

3.6.2.3 Amplification par PCR quantitative

Les ADNc ont été amplifiés par PCR (polymerase chain reaction) à l'aide du système « SYBR® Green PCR Master Mix» (Applied Biosystems, Lennik, Belgique) et des amorces oligonucléotidiques spécifiques des gènes à amplifier. Les oligonucléotides que nous avons utilisés sont répertoriés dans le tableau 6. Pour la PCR, une phase d'activation initiale (10 min à 95°C) a été réalisée, suivie de 40 cycles des phases suivantes : 1 phase de dénaturation (15 secondes à 95°C) et 1 phase d'hybridation/élongation (1 min à 60°C).

L'amplification des ADNc issus de la RT des miRs a été réalisée avec le kit « miScript SYBR Green PCR » (Qiagen), sur une quantité d'ADNc comprise entre 2 et 40 ng Les amorces utilisées pour cette PCR comprennent une amorce universelle fournit par le kit, et s'hybridant avec la séquence Tag incorporée par l'oligo-dT, et une amorce spécifique du microARN ciblé. Les oligonucléotides utilisés pour l'analyse de miRs sont répertoriés dans le tableau 6. Le mélange réactionnel comprend une HotStarTaq ADN Polymerase, le tampon de réaction, le Sybr Green, les dNTP, un fluorophore passif de référence ROX et 2,5 mM de MgCl2. Pour la PCR, une phase d'activation initiale (15 min à 95°C) a été réalisée, suivie de 35 à 40 cycles des phases suivantes : 1 phase de dénaturation (15 secondes à 94°C), 1 phase d'hybridation (30 secondes à 55°C), 1 phase d'élongation (30 secondes à 70°C) et une étape de dissociation de l'ADN amplifié, afin de valider l'efficacité de la PCR.

Tableau 6: Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR.

Le nom des gènes cibles et les paires de séquences des oligonucléotides ayant servi d'amorces pour l'amplification par PCR en temps réel sont indiqués dans le tableau suivant.

Oligonucléotides	Taille (Pb)	Séquences	Gènes
Sens	20	5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'	Actine β
Anti-sens	23	5'-AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA-3'	
Sens	19	5'-TGCTCCATGAGGAGACACC-3'	c-Myc
Anti-sens	23	5'- TCGATTTCTTCCTCATCTTCTTG -3'	
Sens	22	5'-TCATCCGAGAGATGCTCATGCG-3'	COX-1
Anti-sens	20	5'-TTGGTTCCCATGGGTGTGGG-3'	
Sens	21	5'-GCCCAGCACTTCACGCATGAG-3'	COX-2
Anti-sens	24	5'-AGACCAGGCACCAGACCAAAGACC-3'	
Sens	20	5'-GGCAACTGAAGCCTTTTGAG-3'	GSTP1
Anti-sens	20	5'-GGCTAGGACCTCATGGATCA-3'	
Sens	20	5'-CCGGTTCAACGTCATTGGTG-3'	MDR1
Anti-sens	20	5'-AGCCACGTAGAACCTCTGGA-3'	
Sens	20	5'-CCGGTTCAACGTCATTGGTG-3'	MRP1
Anti-sens	20	5'-AGCCACGTAGAACCTCTGGA-3'	
Anti-sens	20	5'-AGCCACGTAGAACCTCTGGA-3'	p16
Anti-sens	20	5'-TTCTTTCAATCGGGGATGTC -3'	

Oligonucléotides	Taille (Pb)	Séquences	Gènes
Sens	**20**	**5'TGCACAAAATGGATTTGGAA-3'**	**p18**
Anti-sens	**20**	**5'-CGAAACCAGTTCGGTCTTTC-3'**	
Sens	**20**	**5'-CCGTGGGGTTATGTATCAG-3'**	**p19**
Anti-sens	**20**	**5'-AAGCCACAAACTGTGCTCCT-3'**	
Sens	**20**	**5'-GACTCTCAGGGTCGAAAACG -3'**	**p21**
Anti-sens	**20**	**5'-GGATTAGGGCTTCCTCTTGG -3'**	
Sens	**20**	**5'-AATAAGGAAGCGACCTGCAA -3'**	**p27**
Anti-sens	**20**	**5'-GGGGAACCGTCTGAAACATT -3'**	
Sens	**20**	**5'-GGCGTGAACCTCACCAGTAT -3'**	**PCNA**
Anti-sens	**20**	**5'-AGGTATCCGCGTTATCTTCG -3'**	

Tableau 7: Séquences des oligonucléotides utilisés pour les expériences d'amplification par PCR pour les miRs.

Le nom des gènes cibles et les paires de séquences des oligonucléotides ayant servi d'amorces pour l'amplification par PCR en temps réel sont indiqués.

Oligonucléotides	Taille (Pb)	Séquences	Gènes
Sens	**22**	**5'-**CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU **-3'**	**miR-34a**
Sens	**21**	**5'-**CUAUACAAUCUACUGUCUUUC**-3'**	**Let-7a**
Sens	**22**	**5'-**CUAUACAACCUACUGCCUUCCC**-3'**	**Let-7b**
Sens	**22**	**5'-**UAGAGUUACACCCUGGGAGUUA**-3'**	**Let-7c**
Sens	**22**	**5'-**CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU**-3'**	**Let-7d**
Sens	**22**	**5'-**CUAUACGGCCUCCUAGCUUUCC**-3'**	**Let-7e**
Sens	**22**	**5'-**CUAUACAAUCUAUUGCCUUCCC **-3'**	**Let-7f**
Sens	**22**	**5'**CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU**-3'**	**Let-7i**

3.7 Etude de l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur la production de prostaglandine E2 par ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay).

La concentration de PGE2 dans le surnageant a été déterminée par ELISA compétitif (EIA, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) à l'aide de PGE2 couplés à de l'acétylcholinesterase (traceur). Le protocole a été réalisé selon les conditions décrites par le fournisseur.

Les cellules ont été ensemencées à 500000 cellules/mL pour le traitement avec les inhibiteurs de COX-2. Après 24h, les cellules ont été comptées, centrifugées et 50µL de surnageant ont été collectés pour la détermination de la production de PGE2. Les concentrations en PGE2 (pg/mL) ont été déterminées à l'aide d'une gamme étalon et ont été normalisées pour un million de cellules. Nous avons utilisé des cellules K562 traitées par 160nM de PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) pendant 24h comme contrôle positif (Kang *et al.* 1998).

3.8 Etude de la différenciation cellulaire

3.8.1 Etude de l'expression de marqueurs de différenciation myéloïde

La différenciation cellulaire a été évaluée par l'analyse de l'expression des marqueurs de surface CD11b, CD14 et CD15, des marqueurs de surface caractéristiques de la lignée myéloïde. Pour les marqueurs de différenciation mégacaryocytiques, nous avons utilisé CD41a et CD61 (Hassan *et al.* 1995).

Un million de cellules ont été récupérées et lavées deux fois dans du PBS. Le surnageant a été retiré et les cellules ont été resuspendues dans 100µL de PBS. 15µL d'anticorps monoclonal CD11b, CD14, CD15, CD41a ou CD61 (BD Biosciences) ont alors été ajoutés. Les anticorps sont couplés à un fluorophore qui est la FITC (fluorescein isothiocyanate) pour les anticorps CD11b et CD14 et la phycoérythrine pour CD15. La longueur d'onde d'excitation de la phycoérythrine est de 488 nm et la longueur d'onde d'émission est de 580 nm. Pour la FITC, ces longueurs d'ondes sont respectivement de 494 nm et 521 nm. Pour chaque échantillon, des contrôles isotypiques, c'est à dire les échantillons

marqués avec des anticorps couplés au fluorophore mais dépourvu de la partie spécifique de l'épitope, ont été utilisés.

Les échantillons ont été incubés dans l'obscurité pendant 1h à 4°C, puis lavés deux fois avec du PBS. Le surnageant a été retiré et les cellules ont été fixées dans 100µL de paraformaldéhyde (4%, m/v). Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 10 min à 4°C, puis lavées au PBS deux fois. Le surnageant a été retiré et 300µL de PBS ont été ajoutés au culot de cellules. Les échantillons ont été analysés par cytométrie en flux. Les données, compte tenu de la longueur d'onde d'émission de la phycoérythrine et de la FITC, ont été récupérées avec les capteur FL2 et FL1 respectivement. Les données récoltées ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Flow-Jo.8.8.5.

3.8.2 Etude de la différenciation érythroïde par le test à la benzidine

Le test à la benzidine permet de mettre en évidence la différenciation érythroïde. L'hémoglobine, présente dans les érythrocytes peut réduire le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène qui va alors oxyder la benzidine et donner une coloration bleue. Par conséquent, seules les cellules possédant de l'hémoglobine deviendront bleues.

Une solution stock de chlorydrate de benzidine (Fluka Chimika) 0,2% (m/v) a d'abord été préparée en dissolvant le chlorydrate de benzidine dans une solution d'acide acétique 0,5 M.

Les cellules (300000) ont été récupérées, centrifugées (350g pendant 5 min), lavées deux fois dans du PBS, puis resuspendues dans 100µL d'une solution de NaCl 0,9% (m/v). Puis 50µL d'une solution de benzidine/ H_2O_2 (500µL de benzidine 0,2% m/v et 10µL de H_2O_2) ont été ajoutés. Après 20 min d'incubation dans cette solution à l'obscurité et à température ambiante, les échantillons ont été dilués dans 300µL de NaCl 0,9% (m/v). La suspension cellulaire obtenue a été déposée sur une cellule de Malassez et les cellules positives à la benzidine ont été comptées au microscope à contraste de phase. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules bleues par rapport au nombre total de cellules.

3.9 Etude de la senescence par observation de l'activité β-galactosidase intracellulaire

La sénescence est un processus cellulaire caractérisée par une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Schmitt 2007), la présence de vacuoles lipidiques

dans les cellules, la présence de SAHF (Senescence-Associated Heterochromatine Foci) (te Poele *et al.* 2002), de cellules géantes et d'une augmentation de l'activité β-galactosidase associée à une augmentation de la masse lysosomiale (Dimri *et al.* 1995 ; Kurz *et al.* 2000).

L'activité β-galactosidase (β-gal) a été étudiée à l'aide d'un kit mesurant la conversion d'un substrat incolore (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, X-gal) en produit coloré en bleu (Sigma Aldrich, Bornem, Belgium). Les cellules (1 million) ont été prélevées et lavées deux fois dans du PBS avant d'être fixées dans une solution de paraformaldéhyde selon les instructions du fournisseur. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 10 minutes à 37°C dans une solution acide (pH 6.0) contenant un substrat de la β-galactosidase, le X-gal. Après une nuit d'incubation à 37°C, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS et le marquage a été apprécié par microscopie (Leica, DM 2000, Lecuit, Luxembourg).

3.10 Etude de la masse lysosomiale

La masse lysosomiale a été étudiée à l'aide d'un fluorophore ayant une forte affinité pour les compartiments intracellulaires acides et particulièrement les lysosomes. Les cellules ont été incubées en présence de 50nM de LysoTrackerRed® (Invitrogen) pendant 30min à 37°C puis la masse lysosomiale a été observée par microscopie à fluorescence et quantifiée par cytométrie en flux (capteur FL3). Les données récoltées ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Flow-Jo.8.8.5.

3.11 Évaluation de l'apoptose

3.11.1 Etude de la morphologie nucléaire

La morphologie nucléaire a été étudiée à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342 (Sigma Aldrich), un agent intercalant dont la longueur d'onde d'excitation est de 350 nm et la longueur d'onde d'émission est de 450 nm à la concentration finale de 100 µM pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules présentant une chromatine sous forme de « mottes » (condensation de la chromatine) ou des noyaux fragmentés ont été comptés à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica-DM IRB microscope, Lecuit, Luxembourg).

3.11.2 Étude du potentiel membranaire mitochondrial

Le potentiel membranaire mitochondrial a été évalué à l'aide de la chloromethyl-X rosamine (MitoTracker Red) (Invitrogen, Merelbeke, Belgique). Les composés dénommés « MitoTracker » ont la capacité de s'accumuler dans la mitochondrie, où ils peuvent réagir avec un groupement « Thiol » sur les peptides et protéines. La réaction engendre un conjugué aldéhyde fluorescent. En effet, plus le potentiel membranaire mitochondriale est fort, plus le marquage est important. Ce potentiel est important dans les cellules vivantes. Cependant, lors de l'apoptose, une chute de ce potentiel est observée. Le composé est excité à une longueur d'onde de 579 nm et émet à une longueur d'onde de 599 nm. La fluorescence émise a été analysée par cytométrie en flux (FACScalibur, BD Biosciences).

Le MitoTracker Red® a été directement ajouté dans les cellules en culture à la concentration finale de 50nM. Après ajout du composé, les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 15 min puis analysés par cytométrie en flux (FACScalibur, BD Biosciences) en utilisant le canal FL2. Les données récoltées ont été analysées à l'aide du logiciel Flow-Jo.8.8.5.

3.11.3 Étude de la libération du cytochrome c par la mitochondrie

L'apoptose est un processus qui s'accompagne d'une libération de cytochrome c par la mitochondrie (Coppola and Ghibelli 2000). Ce protocole consiste à marquer par immunofluorescence le cytochrome c se trouvant dans la mitochondrie.

La libération du cytochrome c par la mitochondrie a été évaluée par immunofluorescence indirecte. Un anticorps primaire se fixe à la cible. Puis cet anticorps est marqué par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dont la fluorescence émise est observée par microscopie à fluorescence.

Deux millions de cellules ont été centrifugées à 280g pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant a été retiré et le culot solubilisé dans 2mL de solution de perméabilisation (0,02M-KCl, 0,00005% Digitonin dans du PBS) Les cellules ont ensuite été incubées pendant 5 min à 4°C.

La seconde étape consiste à fixer les cellules. Le surnageant a été retiré et le culot a été solubilisé dans 400µL d'une solution à 4% de paraformaldéhyde (m/v) dans du PBS. Après un temps d'incubation de 20 min à température ambiante dans l'obscurité, les échantillons ont été centrifugés à 280g pendant 5 min. Le culot a ensuite été lavé deux fois avec 1mL de PBS, puis solubilisé dans 1mL de PBS et incubé pendant 2h à 4°C dans l'obscurité.

La troisième étape consiste à marquer les cellules avec l'anticorps primaire ciblant le cytochrome c. Les échantillons sont centrifugés à 280g pendant 5 min. Le surnageant a été retiré et les culots ont été solubilisés dans 400µL de tampon de blocage (3% ASB, 0,05% saponine dans du PBS). Après 1h d'incubation à température ambiante dans l'obscurité, les échantillons ont été centrifugés à 600g pendant 5 min. Le culot a été resuspendu dans 100µL d'une solution de tampon de blocage contenant l'anticorps primaire (1/50) ciblant le cytochrome c (Santa Cruz). Les échantillons ont été incubés à 4°C, à l'obscurité et sous agitation pendant 18h.

Ensuite, 1 mL de PBS a été ajouté à chaque échantillon. Puis, les échantillons ont été centrifugés à 600g pendant 5 min et le culot a été resuspendu dans 100µL de tampon de blocage contenant l'anticorps secondaire (1/100, lapin, Alexa 568). Les échantillons ont été incubés ainsi à température ambiante, sous agitation pendant une heure puis lavés avec du PBS.

Enfin, les culots ont été resuspendus dans 200µL de PBS froid. Le signal a été analysé par cytométrie en flux à l'aide du capteur FL1 (BD FACSCalibur Becton-Dickison). Les données récoltées ont été analysées à l'aide du logiciel Flow-Jo.8.8.5.

3.11.4 Étude de l'activation et de la translocation mitochondriale de Bax et de Bak

L'activation des protéines Bax et Bak nécessite un changement conformationnel. L'activation de Bax passe par l'exposition de l'épitope 6A7 (Martin-Latil *et al.* 2007) (Peyerl, Dai et al. 2007). Pour Bak, il s'agit de l'épitope Ab-1 (Griffiths, Dubrez et al. 1999). L'activation de ces deux protéines a été étudiée par immunofluorescence en ciblant ces deux épitopes.

La translocation de ces protéines vers la mitochondrie a été mise en évidence en étudiant la co-localisation de ces protéines avec d'autres protéines mitochondriales comme par exemple la cytochrome c oxydase IV (COX IV) (Khalimonchuk *et al.* 2005).

Un million de cellules ont été récupérées et fixées dans une solution de fixation et de perméabilisation (cytofix/cytoperm : BD Biosciences Pharmingen, Erembodegem, Belgique) selon les instructions du fournisseur. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 20 min à 4 °C dans l'obscurité puis lavées deux fois avec du tampon de lavage (centrifugation à 600g). Puis, 60µL de tampon de perméabilisation/lavage (« Permwash ») ont été ajoutés à chaque échantillon, ainsi que l'anticorps primaire ciblant les formes actives ou non de Bax ou de Bak. Deux anticorps pour Bax ont été utilisés. Le premier reconnaît la forme inactive et se fixe sur l'épitope Δ21 (1/50 - Santa Cruz Biotechnology, Boechout, Belgique). Le second se fixe sur la protéine active sur l'épitope 6A7 (1/30-Santa-Cruz). Les cellules ont été lavées deux fois dans du tampon de lavage, puis resuspendues dans 60µL de tampon de perméabilisation/lavage contenant l'anticorps secondaire pour Bax (1/50, Santa-Cruz). Pour Bak, un marquage pour la forme active a été réalisé en ciblant l'épitope Ab-1 (1/40). Les cellules ont ensuite été lavées deux fois dans du tampon de lavage puis resuspendues dans 60µL de tampon de perméabilisation/lavage contenant l'anticorps secondaire pour Bak (1/50, souris, Invitrogen, Merelbeke, Belgique)

L'expression et l'activation de Bax ou de Bak a été observée par microscopie à fluorescence (Leica, DM 2000, Lecuit, Luxembourg) et quantifiée par cytométrie en flux (FACScalibur, BD Biosciences, San José, CA, USA). Les données récoltées ont été analysées à l'aide du logiciel Flow-Jo.8.8.5.

Afin d'étudier la translocation de Bax vers la mitochondrie, un co-marquage Bax/COX IV a été réalisé. L'anticorps pour COX IV a été utilisé selon les conditions suivantes : anticorps primaire (1/50, Santa-Cruz) et anticorps secondaire (1/50, souris, Invitrogen).

3.11.5 Test d'efflux de la rhodamine 123

La rhodamine 123 (Sigma Aldrich) est une molécule fluorescente (pic excitation : 485nm ; pic émission : 550 nm) utilisée pour mettre en évidence l'activité des protéines MDR puisque cette molécule peut être expulsée par la glycoprotéine-P ou les MRPs (Dogan *et al.* 2004 ; Zrieki, Farinotti et al. 2008).

Pour le test à la rhodamine 123, les cellules ont été incubées avec 10µM de rhodamine 123 (Sigma Aldrich). Les cellules ont ensuite été lavées et resuspendues dans du milieu frais (RPMI, 10% SVF, 1% antibiotiques). Immédiatement après (t=0), la fluorescence

a été estimée par cytométrie en flux (FL2-H). La même analyse a été répétée après 3h ou 6h (t= 6h). La différence entre t=0 et t=6h représente ainsi la capacité des cellules à rejeter la rhodamine 123. Les données récoltées pour 10000 événements ont été analysées à l'aide du logiciel Flow-Jo.8.8.5.

3.11.6 Evaluation des altérations de l'ADN

Lors d'altérations de l'ADN, l'histone H2AX (histone H2A) est phosphorylée sur la sérine 139 (H2AXγ) par les kinases ATM, ATR et DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) (Takahashi *et al.* ; Kinner *et al.* 2008 ; Darzynkiewicz *et al.* 2009), ce qui fait de cet histone un marqueur spécifique des cassures double-brin de l'ADN. Les altérations de l'ADN ont été évaluées en étudiant l'expression de H2AXγ par immunofluorescence à l'aide du kit « cytofix/cytoperm » (BD Biosciences) comme décrit précédemment (section 3.2.2.2). Pour cette expérience, un anticorps primaire dirigé contre l'histone H2AXγ (ser139; Millipore, Upstate) a été utilisé. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois dans du tampon de lavage, puis resuspendues dans 60µL de tampon de perméabilisation, contenant l'anticorps secondaire (1/50, souris). La fluorescence a été évaluée par cytométrie en flux pour 10000 événements. Les données récoltées ont été analysées à l'aide du logiciel Flow-Jo.8.8.5.

3.12 Analyse statistique

Les différences entre échantillons et témoins ont été évaluées à l'aide de test t de Student pour échantillons indépendants. La différence entre les échantillons a été évaluée à l'aide d'un test ANOVA et du test à posteriori du « t protégé ». Les seuils de significativité utilisés sont de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et, $p < 0,001$ (***).

4 Résultats

Les inhibiteurs de COXs permettent d'obtenir une réduction de l'incidence de nombreux cancers y compris le cancer du côlon, du poumon ou du sein. COX-2 pourrait donc constituer une bonne cible en thérapie anticancéreuse. La plupart des données ne concernent que les tumeurs solides, mais il y aurait aussi un rôle pour COX-2 dans les cancers hématologiques comme les lymphomes ou les leucémies. L'étude de ce rôle et des mécanismes impliqués constitue une base essentielle pour pouvoir mener au mieux une stratégie anti-cancéreuse efficace. Afin d'étudier le rôle de COX-2 sur la prolifération des différentes lignées cellulaires, nous avons eu recours à trois inhibiteurs spécifiques de cette enzyme qui sont le nimésulide, le NS-398 et le célécoxib.

4.1 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération des lignées cellulaires hématopoïétiques.

Nous avons étudié l'effet des différents inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération des différentes lignées cellulaires à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de trypan. Les différentes lignées cellulaires ont été traitées pendant 24h et 48h avec des concentrations allant de 10 à 100µM pour le nimésulide et le NS-398 et de 10 à 40 µM pour le célécoxib. Nous avons constaté que le nimésulide inhibe la prolifération des cellules Hel, Jurkat, K562, Raji et U937. Cet effet commence dès 24h de traitement (Figure 18) avec un effet significatif à 100µM pour les lignées Hel, Jurkat, Raji et 40µM pour les cellules U937. Après 48h, cet effet est encore plus marqué puisque le nimésulide inhibe la prolifération des cellules Hel à partir de 40µM et le pourcentage d'inhibition de la prolifération à 100µM atteint 53,71 ± 10,34%. Pour la lignée Jurkat, une inhibition significative à partir de 10µM a été observée avec une l'inhibition de la prolifération cellulaire qui atteint 42,35 ± 5,36% pour la concentration maximale. La prolifération des cellules Raji est aussi inhibée à partir de 10µM où une inhibition de la prolifération de 47,28 ± 3,41 % a été observé à 100µM. Les cellules K562 apparaissent comme les cellules les plus résistantes. En effet, la diminution de la prolifération n'est significative que pour la concentration maximale (100µM) après 48h de traitement et ne conduit qu'à une diminution de 22,22 ± 6,18% du taux de prolifération cellulaire.

A

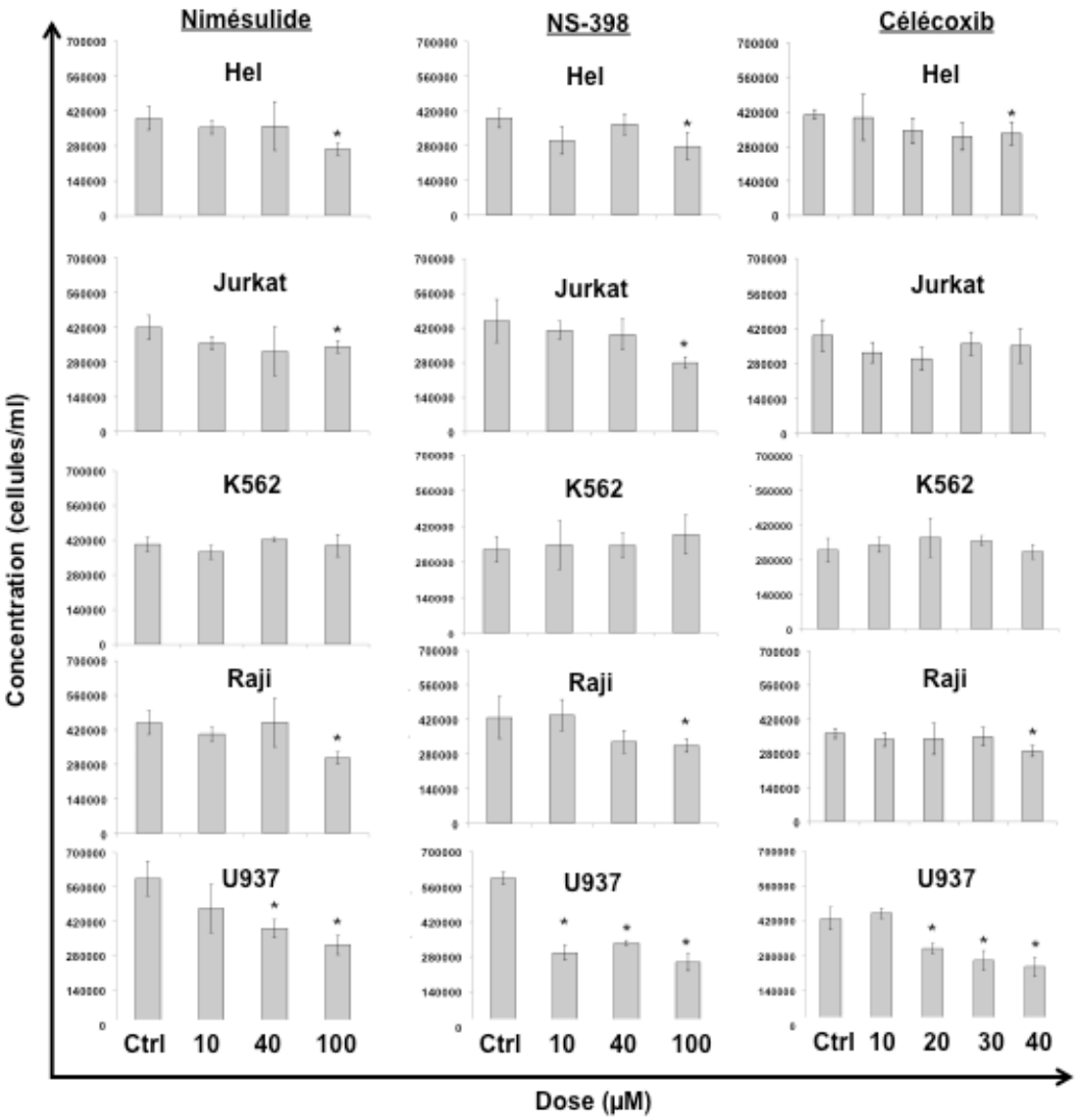
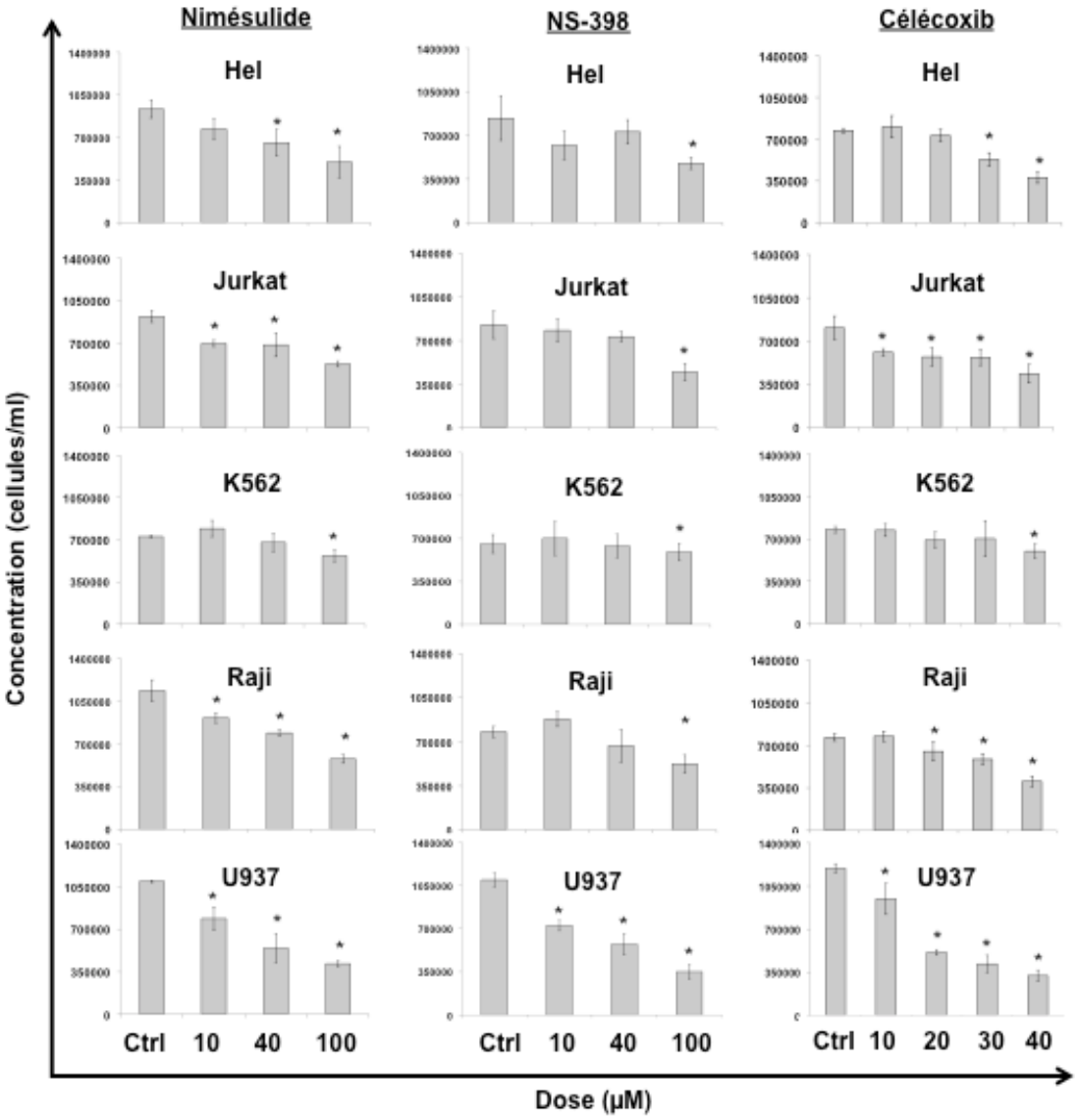


Figure 18 : Evaluation de l'effet de différentes concentrations d'inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération des différentes lignées cellulaires hématologiques.

Les cellules Hel, Jurkat, K562, Raji et U937 ont été ensemencées à la concentration de 200000 cellules/mL lors de l'exposition aux différentes concentrations en nimésulide (10, 40, 100µM), de NS-398 (10, 40, 100µM) ou de célécoxib (10, 20, 30 et 40µM). Les comptages ont été effectués à l'aide d'une coloration d'exclusion au bleu de trypan et d'une cellule de Malassez après 24h (A) et 48h (B) de traitement. Les résultats représentent la moyenne de cinq expériences ± DS (déviation standard). * : $p < 0,05$

B



Légende : voir page précédente

Pour le NS-398, nous avons constaté des effets similaires. De même que précédemment, les cellules U937 sont les plus sensibles au traitement avec une inhibition de la prolifération cellulaire à partir de 10µM pour 24h d'exposition (11,06 ± 2,82%). Pour la concentration maximale, le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire après 24h d'exposition est de 22,27 ± 10,67% et 51,88 ± 10,97% pour 48h d'exposition. Ces pourcentages sont inférieurs à ceux qui ont été observés pour le nimésulide. Après 48h de traitement, une inhibition de la prolifération cellulaire a été observée pour la lignée Hel, dès 10µM (23,02 ± 7,1%) et atteint un maximum de 37,01 ± 3,1% à 100µM. Pour la lignée Jurkat, une diminution de la prolifération cellulaire de 50,25 ± 10,25% a été observée à 100µM. Ce pourcentage est de 36,39± 4,09% pour la lignée Raji. La prolifération de la lignée K562 n'est pas affectée par le traitement.

Le célécoxib inhibe la prolifération des cellules Hel, Jurkat, K562, Raji et U937. Cet effet commence dès 24h pour les cellules Hel et Raji à 100µM et pour U937, dès 10µM. L'effet est donc plus important pour les cellules U937 où le pourcentage d'inhibition de la prolifération est de 26,7 ± 10,6% pour 10µM et atteint 45,4 ± 0,12% pour 40µM. Après 24h de traitement, la prolifération des cellules K562 n'est pas affectée. Après 48h de traitement, l'effet anti-prolifératif du célécoxib est plus marqué. Une inhibition de la prolifération a ainsi été observée dès 10µM pour les cellules Jurkat et U937, dès 20µM pour les cellules Raji et dès 30µM pour les cellules Hel. Une diminution de la prolifération des cellules K562 a aussi pu être observée pour 40µM, avec une diminution de 22,91 ± 8,50%. De même que pour 24h de traitement, les cellules U937 sont les plus sensibles avec une diminution de la prolifération cellulaire de 72,8 ± 4,68% pour la concentration maximale. Il est important de noter aussi que le célécoxib inhibe de manière plus efficace la prolifération des cellules U937 que le nimésulide et le NS-398. Les doses permettant d'avoir une diminution de la prolifération cellulaire de 50% pour le nimésulide, le NS-398 et le célécoxib, dans la lignée U937 (IC50) sont respectivement de 55,32 ± 11,11, de 59,88 ± 5,78 et de 27,38 ± 3,68µM.

Les résultats obtenus avec la coloration d'exclusion au bleu de trypan ont été confirmés par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage au CFSE (voir Matériels et méthodes, 3.2.2) (Figure 19). Nous avons remarqué que les cellules traitées par le nimésulide, le NS-398 ou le célécoxib ne perdent pas leur intensité de fluorescence comme observée avec les cellules non-traitées après 48h de traitement. Nos résultats témoignent donc d'une inhibition de la prolifération cellulaire. L'effet est significatif dès 10µM pour les cellules U937 traitées par le nimésulide ou par le célécoxib et dès 40µM pour le traitement par le NS-

398. Pour les cellules K562, un effet significatif a été observé, mais seulement pour la concentration maximale.

Par ailleurs, nous avons étudié l'effet du nimésulide et du célécoxib sur l'index mitotique des cellules U937 (Figure 20). Nous avons ainsi observé que le nimésulide et le célécoxib diminuent le nombre de cellules en mitose avec un effet significatif dès 40µM pour le nimésulide et dès 20µM pour le célécoxib. Ces résultats apportent donc un autre argument quant à l'effet anti-prolifératif des inhibiteurs de COX-2.

En conclusion de cette partie de nos travaux, nous avons observé que les trois inhibiteurs de COX-2 sont aussi capables d'inhiber la prolifération des différentes cellules leucémiques utilisées avec un effet plus important sur la lignée U937 et une faible sensibilité pour la lignée K562. Nous utiliserons majoritairement ces deux lignées cellulaires pour la suite de l'étude.

4.2 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose des différentes lignées cellulaires

Afin de vérifier si l'effet anti-prolifératif observé précédemment est la conséquence d'une induction de mort cellulaire, l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose et la nécrose des cellules U937 a été étudié par observation de la morphologie nucléaire. (Figure 21). Nous avons utilisé des cellules U937 traitées par l'étoposide (100µM) pendant 5h comme contrôle positif. Nous avons ainsi observé que dans ce contrôle que 73,67 ± 7,59% des cellules présentent un noyau fragmenté ou avec une condensation de la chromatine. Ce type de morphologie n'a pas été observé pour les cellules U937 traitées par le nimésulide (100µM), per le NS-398 (100µM) ou par le célécoxib (40µM), ce qui signifie qu'il n'y a pas d'induction d'apoptose. Aucune induction de nécrose n'a été observée. Nous avons confirmé nos résultats pour le nimésulide et le NS-398 par l'étude du clivage de la caspase-3 par Western Blot (Figure 21). En effet, la caspase-3 est clivée durant l'apoptose (activation) comme montré avec le contrôle positif (étoposide). Ce clivage n'a pas été observé avec le nimésulide et le NS-398.

Nous pouvons conclure que les inhibiteurs de COX-2 n'induisent pas l'apoptose. Pour le nimésulide, nous n'observons pas d'apoptose à des concentrations de 10 à 100µM et pour le NS-398 et à des concentrations de 10 à 40µM.

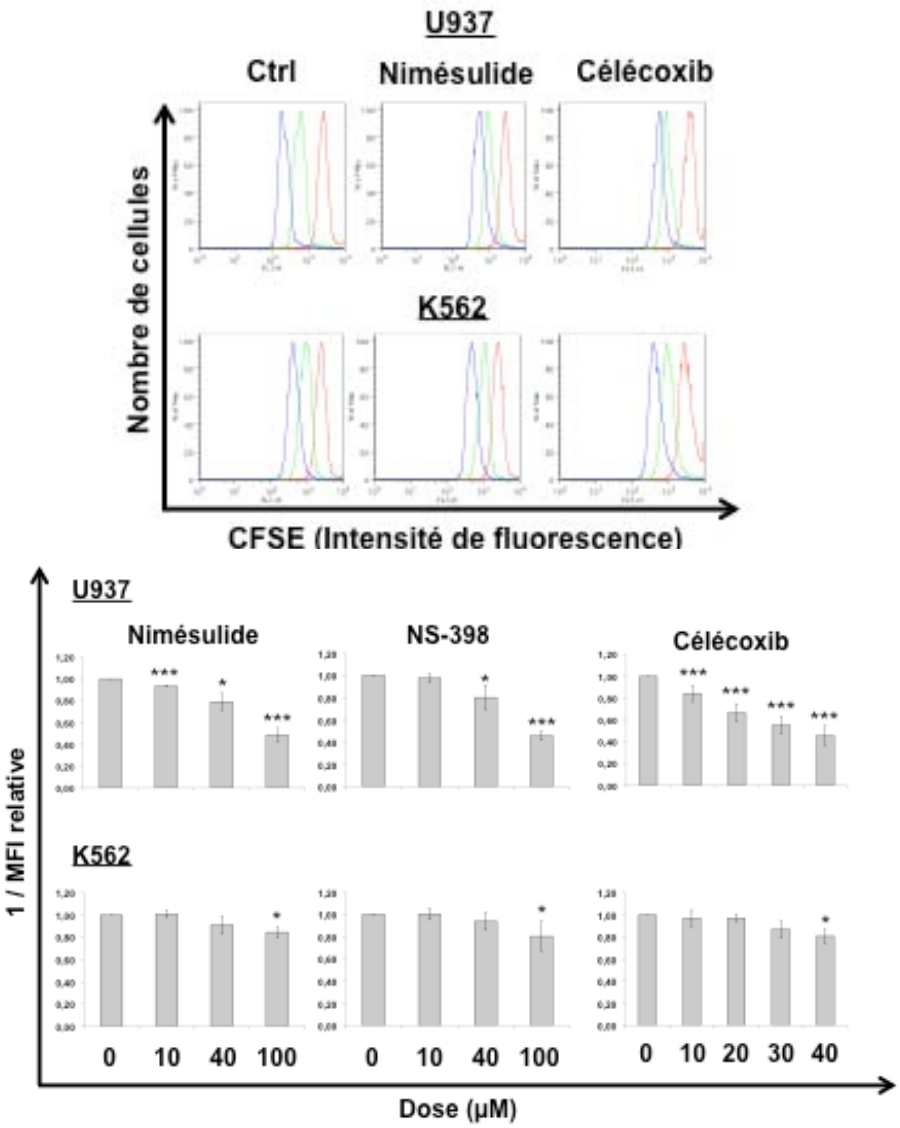
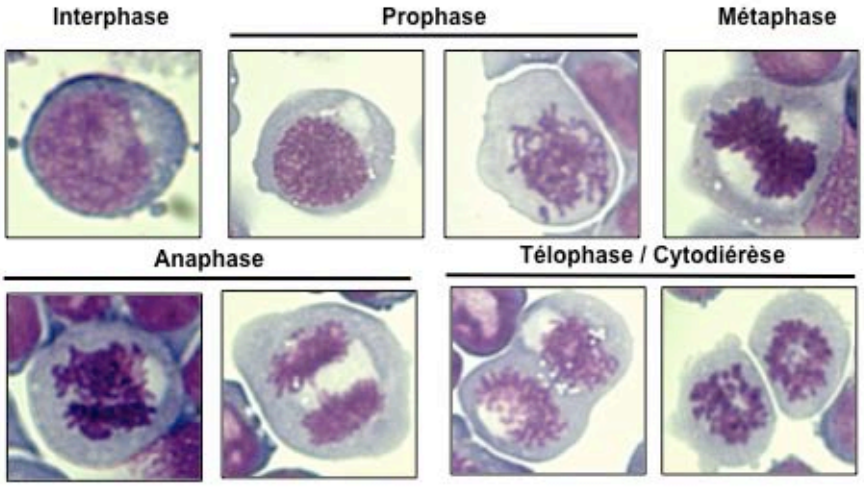


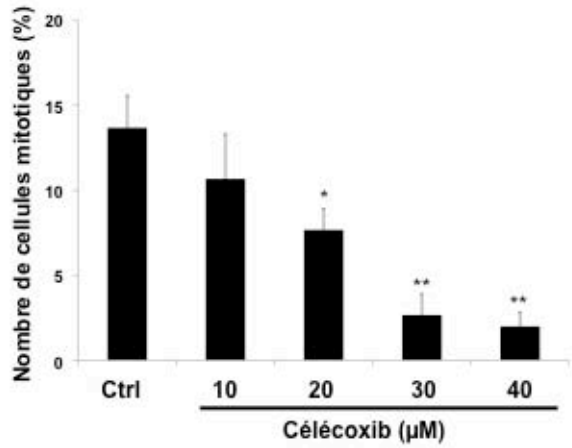
Figure 19 : Evaluation de l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération cellulaire des lignées cellulaire U937 et K562 par marquage au CFSE

Les cellules U937 et K562 ont été marquées avec 0,2µM de CFSE. Les cellules ont alors été traitées par différentes concentrations de nimésulide (10, 40, 100µM), de NS-398 (10, 40, 100µM) ou de célécoxib (10, 20, 30, 40µM). La fluorescence du CFSE a ensuite été mesurée par cytométrie en flux à t=0, 24h et 48h après traitement. Les valeurs de fluorescence de t=48h ont été divisées par les valeurs obtenues à t=0h. Les valeurs obtenues ont ensuite été normalisées par la valeur des échantillons non traités (0) (intensité de fluorescence relative). Comme l'intensité de fluorescence est inversement proportionnelle à la prolifération cellulaire, les résultats ont été représentés par l'inverse de l'intensité de fluorescence relative (1/MFI). Les résultats représentent la moyenne de quatre expériences ± DS (déviation standard). * : p< 0,05 ; **: p< 0,01 ; ***: p< 0,001

A



B



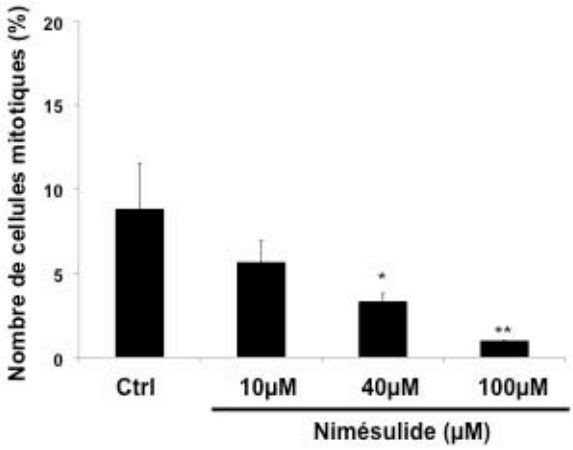
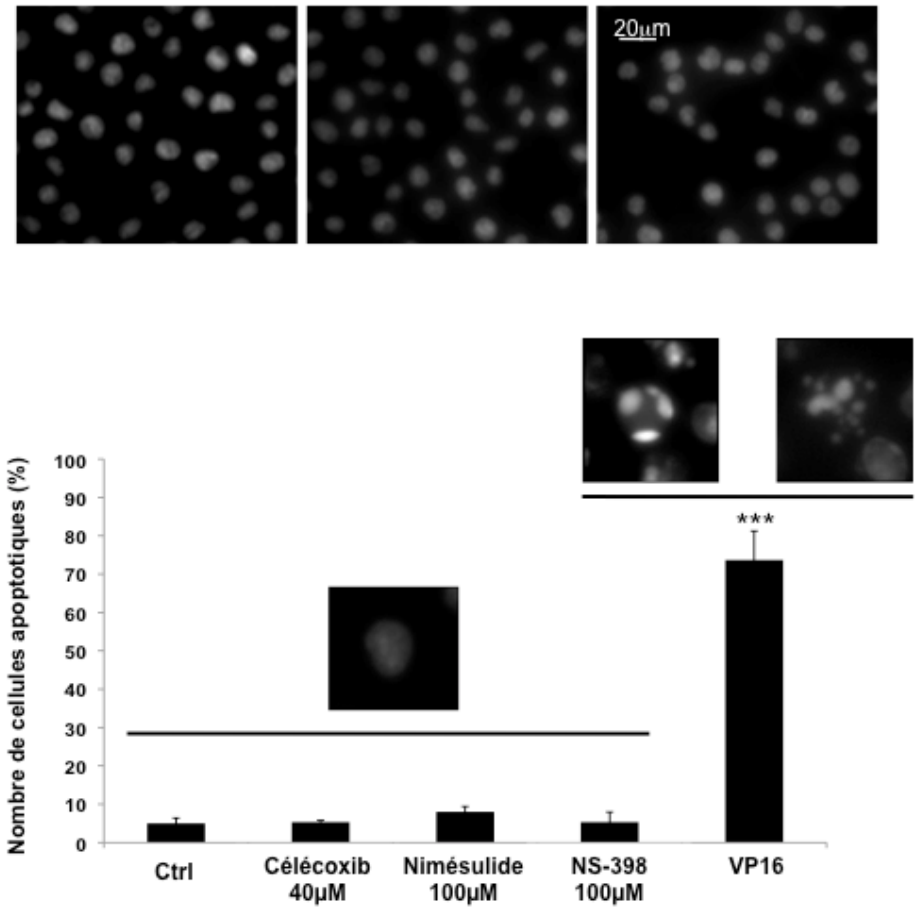


Figure 20: Effet du nimésulide et du célécoxib sur l'index mitotique des cellules U937

Les cellules U937 ont été traitées pendant 48h par du célécoxib (40µM) ou du nimésulide (100µM). Les cellules en mitose ont été comptées par morphologie nucléaire à l'aide d'une coloration de May-Grünwald Giemsa. Les profils de cellules mitotiques sont représentés en **A** et les quantification en **B**. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard).* : p< 0,05 ; **: p< 0,01 ; ***: p< 0,001

A



B

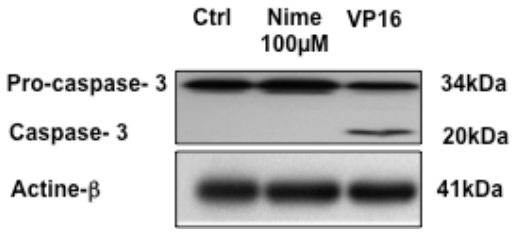


Figure 21 : Evaluation de l'effet des inhibiteurs spécifiques de COX-2 sur l'apoptose des cellules U937

A Les cellules ont été ensemencées à la concentration de 200000 cellules/mL lors de l'exposition au célécoxib (40µM), au nimésulide (100µM) ou au NS-398 (100µM). L'apoptose a été étudiée par morphologie nucléaire à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342 après 6 jours de traitement. Les résultats ont été confirmés par l'étude du clivage de la caspase-3 par Western Blot (**B**). L'étoposide (100µM pendant 5h) a été utilisé comme contrôle positif pour induire l'apoptose. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : contrôle ; * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.3 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur le cycle cellulaire

Nos résultats précédents ont exclu un effet pro-apoptotique des inhibiteurs de COX-2 dans la gamme de concentrations utilisées pour étudier la prolifération des différentes lignées cellulaires (10-100µM pour le nimésulide et le NS-398 et 10-40µM pour le célécoxib). Nos résultats suggèrent ainsi que les inhibiteurs de COX-2 ont un effet sur le cycle cellulaire.

4.3.1 Effet du nimésulide sur le cycle cellulaire

Afin de mieux comprendre à quel niveau la prolifération des cellules U937 est perturbée, nous avons étudié le cycle cellulaire de ces cellules traitées par le nimésulide (10, 40 et 100µM) par cytométrie en flux, à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium (Figure 22). Nous avons ainsi remarqué qu'il y a une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire et une réduction du nombre des cellules en phase S et G2/M après 24h et 48h de traitement. Les résultats présentés ont été obtenus pour 100µM de nimésulide. Pour 24h de traitement, le pourcentage de cellules en phase G0/G1 dans le contrôle est de 40,95 ± 2,49% contre 54,75 ± 4,17% pour les cellules traitées par le nimésulide (100µM). Après 48h, le nombre de cellules en phase G0/G1 passe de 39,82 ± 3,99% pour le contrôle à 51,54 ± 1,82% pour les cellules traitées. Ces résultats sont donc corrélés aux résultats obtenus précédemment avec les tests d'exclusion au bleu de trypan.

Afin de montrer que cet effet n'est pas exclusif d'une seule lignée cellulaire, nous avons étudié l'effet du nimésulide (100µM) sur le cycle cellulaire des cellules Hel, Jurkat et Raji après 48h de traitement (Figure 23). Nous avons pu observer qu'il y a une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire pour les lignées Hel et Raji traitées par le nimésulide, mais moins importante que pour la lignée U937. Cet effet s'accompagne aussi d'une diminution du nombre de cellules en phase S et G2/M.

Pour toutes les lignées cellulaires, l'absence de pic sub G1, correspondant aux cellules apoptotiques, confirme l'absence d'apoptose pour les concentrations choisies. Il y a donc une bonne corrélation entre la sensibilité des différentes lignées aux inhibiteurs de COX-2 et l'accumulation en phase G0/G1 du cycle cellulaire.

4.3.2 Effet du NS-398 sur le cycle cellulaire

De même que pour le nimésulide, nous avons étudié le cycle cellulaire des lignées U937 et K562 traitées par le NS-398 (100µM) **(**Figure 24**).** Comme pour le nimésulide, nous avons observé une accumulation des cellules U937 en phase G0/G1 et une réduction du nombre de cellules en phase S et G2/M. Pour 24h de traitement, le pourcentage de cellules en phase G0/G1 dans le contrôle est de 42,5 ± 2,98% contre 55,82 ± 3,52% pour les cellules traitées par le nimésulide (100µM). La modification du profil du cycle cellulaire est similaire à celle observée avec le nimésulide et n'a pas été observée pour la lignée K562 même après 48h d'exposition.

4.3.3 Effet du célécoxib sur le cycle cellulaire

L'effet du célécoxib sur le cycle cellulaire des lignées U937 et K562 a aussi été étudié par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium (Figure 25). Nous avons constaté que pour le nimésulide et le NS-398, le traitement des cellules U937 par le célécoxib (10-40µM) conduit à une accumulation de ces dernières en phase G0/G1 du cycle cellulaire et cet effet et d'autant plus important que la concentration est grande. L'effet maximum peut donc être clairement observé pour 40µM et 48h d'exposition. A cette concentration, 69,63 ± 11,25% des cellules se trouvent en G0/G1 après 24h et 66 ± 5,43% après 48h. Ces valeurs sont similaires à celles obtenues avec 100µM de nimésulide ou de NS-398, ce qui montre que le célécoxib est plus efficace pour inhiber la progression du cycle cellulaire des cellules U937 que les deux autres inhibiteurs. Ces résultats confirment donc la capacité plus importante du célécoxib à inhiber la prolifération des cellules U937, observée précédemment. L'accumulation des cellules en phase G0/G1 est associée à une diminution du nombre de cellules en phase S et G2/M qui n'a pas été observée pour les cellules K562. Par ailleurs, l'absence de pic sub G1 confirme l'absence d'apoptose induite par le célécoxib comme montré précédemment par morphologie nucléaire.

En conclusion, ces résultats montrent que les inhibiteurs de COX-2 diminuent la prolifération des cellules Hel, Jurkat, Raji et U937 *via* une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Cet effet peut être la conséquence d'une modulation des acteurs de la transition G0/G1 ou G1/S du cycle cellulaire.

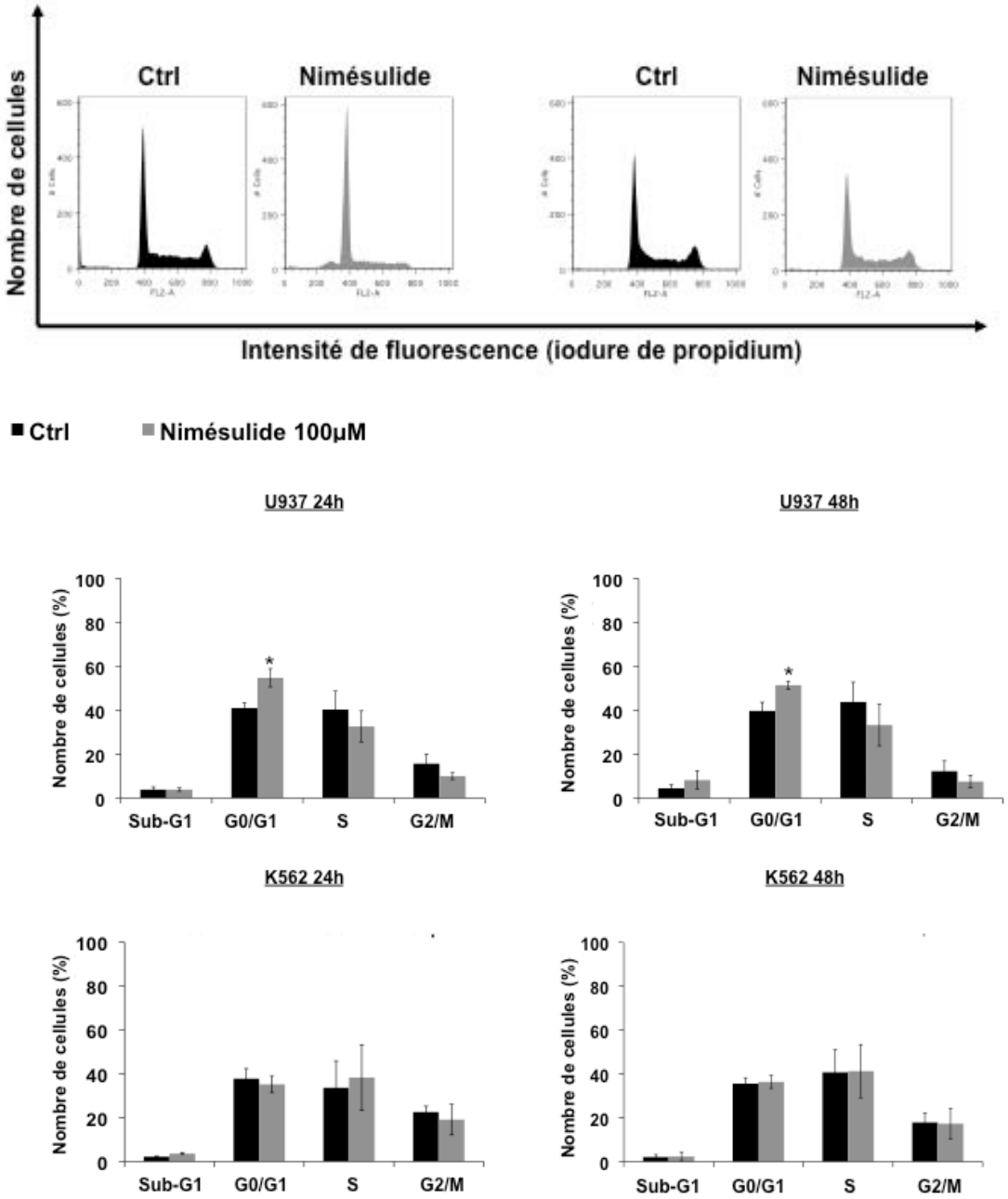


Figure 22: Effet du nimésulide sur la distribution du cycle cellulaire des cellules U937 et K562

Les cellules U937 et K562 ont été traitées pendant 24h et 48h par le nimésulide (100µM). Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium. Le nombre de cellules dans chaque phase (Sub-G1, G0/G1, S, G2/M) a été évalué. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). (Ctrl : Contrôle ; Sub-G1 : Cellules hypodiploïdes). * : $p < 0,05$

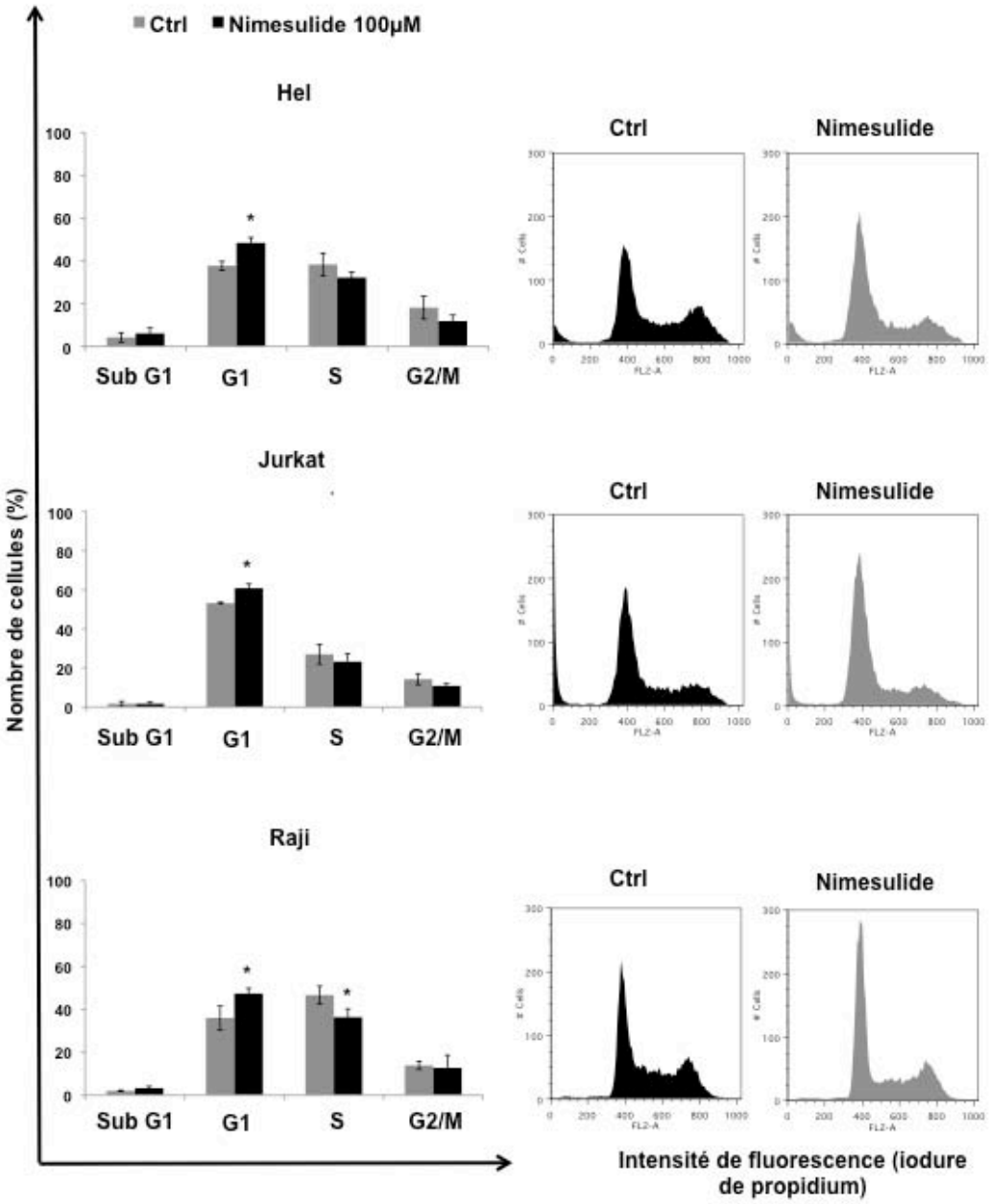


Figure 23: Effet du nimésulide sur la distribution du cycle cellulaire des cellules Hel, Jurkat et Raji

Les cellules Hel, Jurkat et Raji ont été traitées pendant 48h par le nimésulide (100µM). Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium. Le nombre de cellules dans chaque phase (Sub-G1, G0/G1, S, G2/M) a été quantifié. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : Contrôle ; Sub-G1 : Cellules hypodiploïdes. * : $p < 0,05$

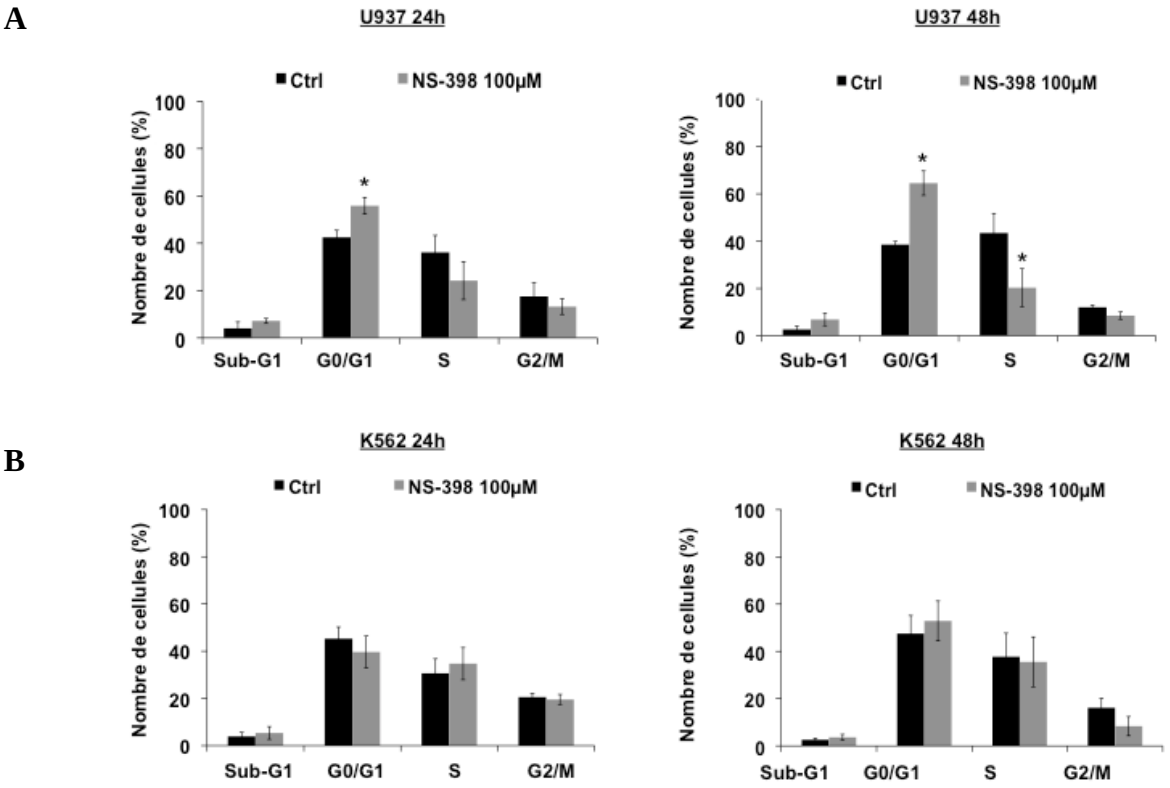
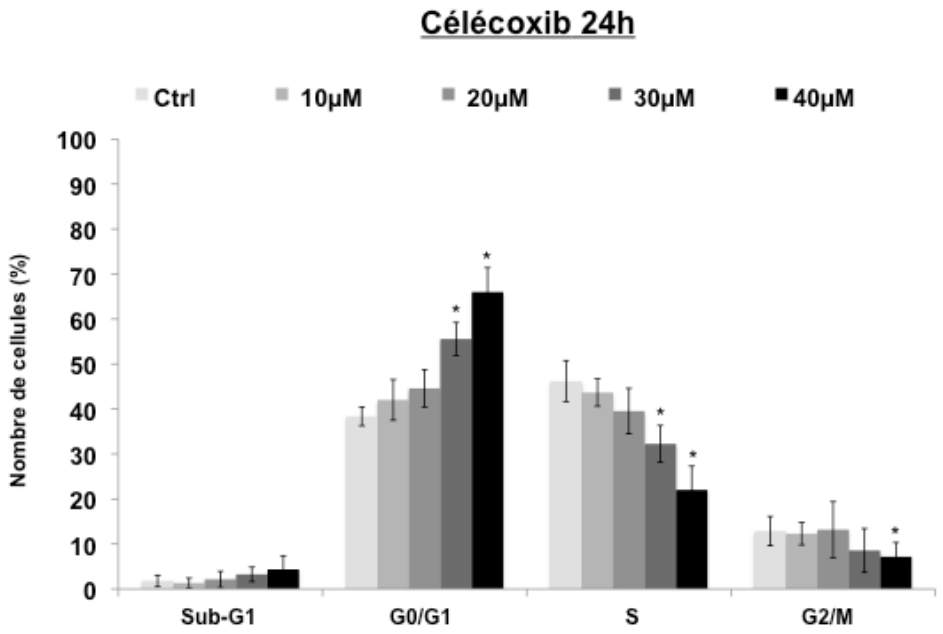


Figure 24: Effet du NS-398 sur la distribution du cycle cellulaire des cellules U937 et K562

Les cellules U937 (**A**) et K562 (**B**) ont été traitées pendant 24h et 48h par le NS-398 (100µM). Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium. Le nombre de cellules dans chaque phase (Sub-G1, G0/G1, S, G2/M) a été évalué. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : Contrôle ; Sub-G1 : Cellules hypodiploïdes. * : $p < 0,05$

A



B

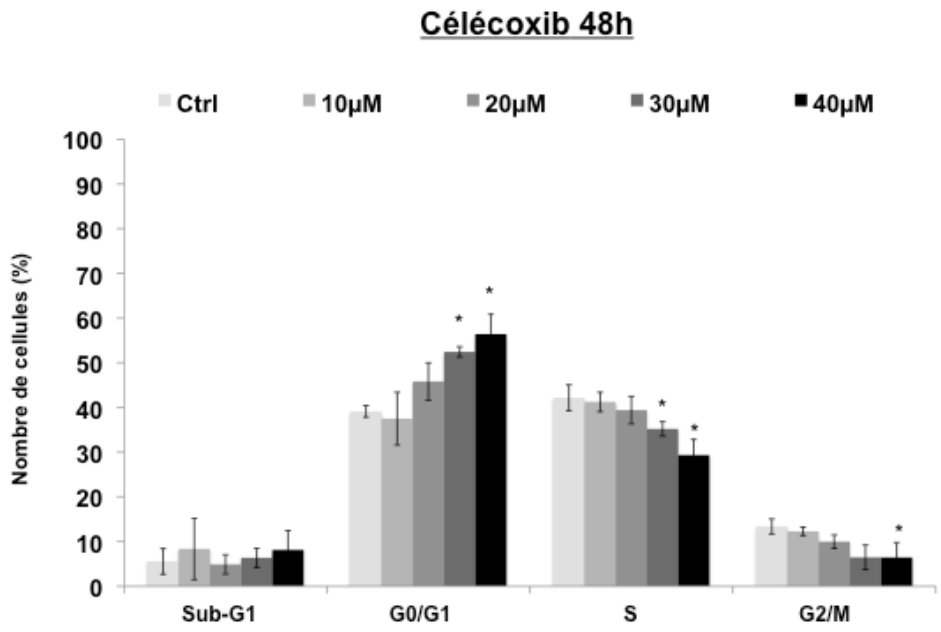


Figure 25: Effet du célécoxib sur la distribution du cycle cellulaire des cellules U937 et K562

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h (**A**) et 48h (**B**) par du célécoxib (10-40µM). Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium. Le nombre de cellules dans chaque phase (Sub-G1, G0/G1, S, G2/M) a été évalué. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : Contrôle ; Sub-G1 : Cellules hypodiploïdes. * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.3.4 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression d'acteurs de la transition G1/S du cycle cellulaire

Précédemment, nous avons observé une accumulation en phase G0/G1 des cellules U937 traitées par les inhibiteurs de COX-2. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'inhibition du cycle cellulaire mis en jeu, l'expression de différents acteurs du cycle cellulaire impliqués dans la transition G0/G1 et G1/S a été analysée par PCR en temps réel. Ainsi, les niveaux d'expression de p18, p19, p21, p27, de la cycline D1 et de PCNA ont été évalués dans les cellules U937 traitées pendant 24h et 48h à différentes concentrations de nimésulide, NS-398 (10, 40 et 100µM) ou de célécoxib (10, 20, 30 et 40µM).

Pour le nimésulide (Figure 26), l'étude a montré une diminution de l'expression de PCNA d'un facteur 0,82 ± 0,06 pour 48h de traitement à 100µM. Nous avons aussi observé une diminution de l'expression de la cycline D1 significative après 24h de traitement dès 100µM. Après 48h de traitement, à 100µM, le facteur de réduction est de 0,58 ± 0,18. Aucune modification de l'expression de ces acteurs du cycle cellulaire n'a été observée dans les cellules K562 (Figure 26). Par ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus avec le NS-398 et le célécoxib (Figure 26).

L'expression de PCNA est sous la dépendance du facteur de transcription E2F et de la phosphorylation du facteur Rb qui le séquestre dans le cytoplasme (Stewart, Westfall et al. 2003). Le niveau de phosphorylation de Rb dépend des Cdks et des Cdki (p18, p19, p21, p27). Dans notre étude, la diminution de l'expression de PCNA suggère une inhibition de la phosphorylation de Rb. Ces résultats nous ont donc conduis à analyser l'expression de Cdki (Figure 26). Nous avons montré par PCR en temps réel une augmentation de l'expression de p27 après 24h et 48h de traitement par le nimésulide dans les cellules U937 mais pas dans les cellules K562 (Figure 26). Cet effet est significatif à 100µM pour 24h et 48h de traitement avec des pourcentages d'induction de 16,8 ± 0,4% et 17,2 ± 0,38% respectivement. Des résultats similaires ont été observés pour les deux autres inhibiteurs de COX-2, le NS-398 et le célécoxib (Figure 26, Figure 27). Une augmentation de l'expression de p18, p19 a pu aussi être observée dans les cellules U937 mais ces modifications sont aussi présentes dans les cellules K562 (Figure 26). Nous avons aussi exclu p21 puisque nous avons remarqué une diminution du niveau d'ARNm après 48h de traitement avec le nimésulide et le NS-398 et pas de modifications pour les cellules K562. p21 est un inhibiteur du cycle cellulaire et donc une

diminution de son expression serait plutôt compatible avec une accentuation de la prolifération cellulaire. L'ensemble des résultats de PCR en temps réel a été récapitulé dans le tableau 8 Nous nous sommes par conséquent principalement focalisés sur les acteurs modulés dans la lignée U937 et pas dans la lignée K562, c'est à dire, les protéines p27, PCNA et la cycline D1.

Afin de vérifier si les modulations observées au niveau de l'ARNm peuvent être observées au niveau protéique, nous avons évalué l'expression de ces acteurs du cycle cellulaire par Western blot (Figure 28). Les résultats nous ont montré que après 48h de traitement par du nimésulide, il y a une diminution de l'expression de la cycline D1 et de PCNA à 100µM et une augmentation dès 40µM de l'expression de p27. Ces modifications n'ont pas été observées pour la lignée K562. Ainsi les résultats de PCR en temps réel ont été confirmés par Western Blot. Ces différences observées pourraient expliquer pourquoi il y a une inhibition de la prolifération cellulaire et une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire dans le cas des cellules U937 et pas pour les cellules K562.

Pour conclure, nos résultats montrent ici que les inhibiteurs de COX-2 conduisent à une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Cet effet s'accompagne d'une diminution de l'expression de la cycline D1 et d'une augmentation de l'expression de p27.

A

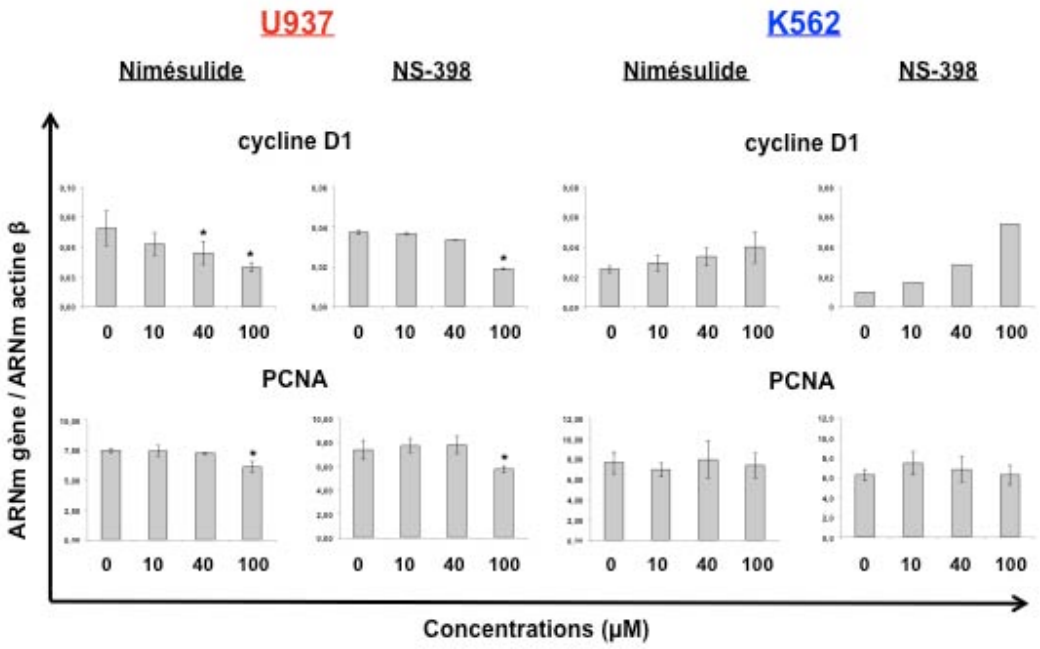
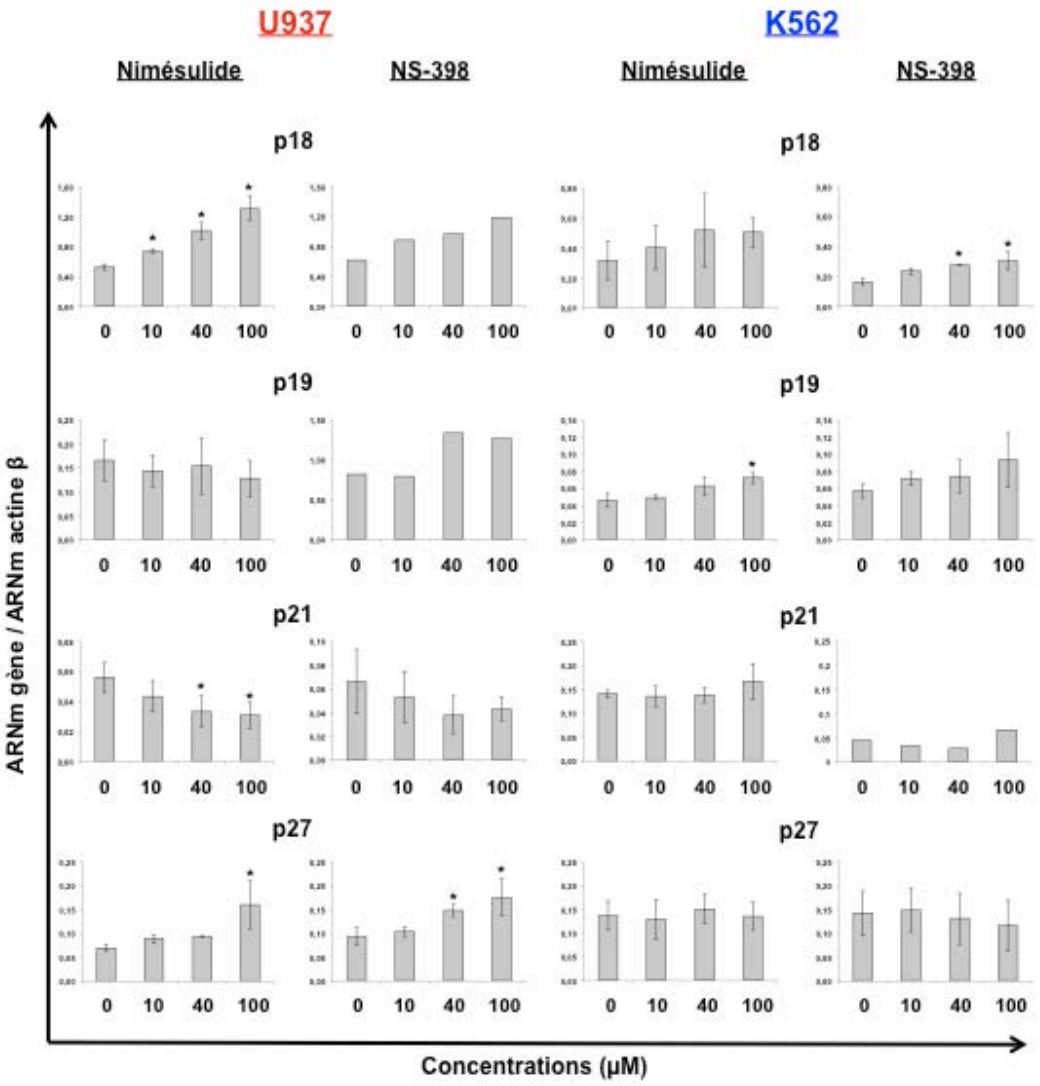


Figure 26 : Etude de l'expression des Cdki du cycle cellulaire dans la lignée K562 traitée avec le nimésulide.

L'expression des ARNm de la cycline D1 et de PCNA (A) et des Cdki p18, p19, p21 et p27 (B) a été étudiée par PCR en temps réel. Les cellules U937 ont été traitées pendant 48h à 10, 40 ou 100µM de nimésulide. Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence (l'actine β). Ces résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences. PCNA : proliferating cell nuclear antigen. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). * : $p < 0,05$

B



Légende : voir page précédente.

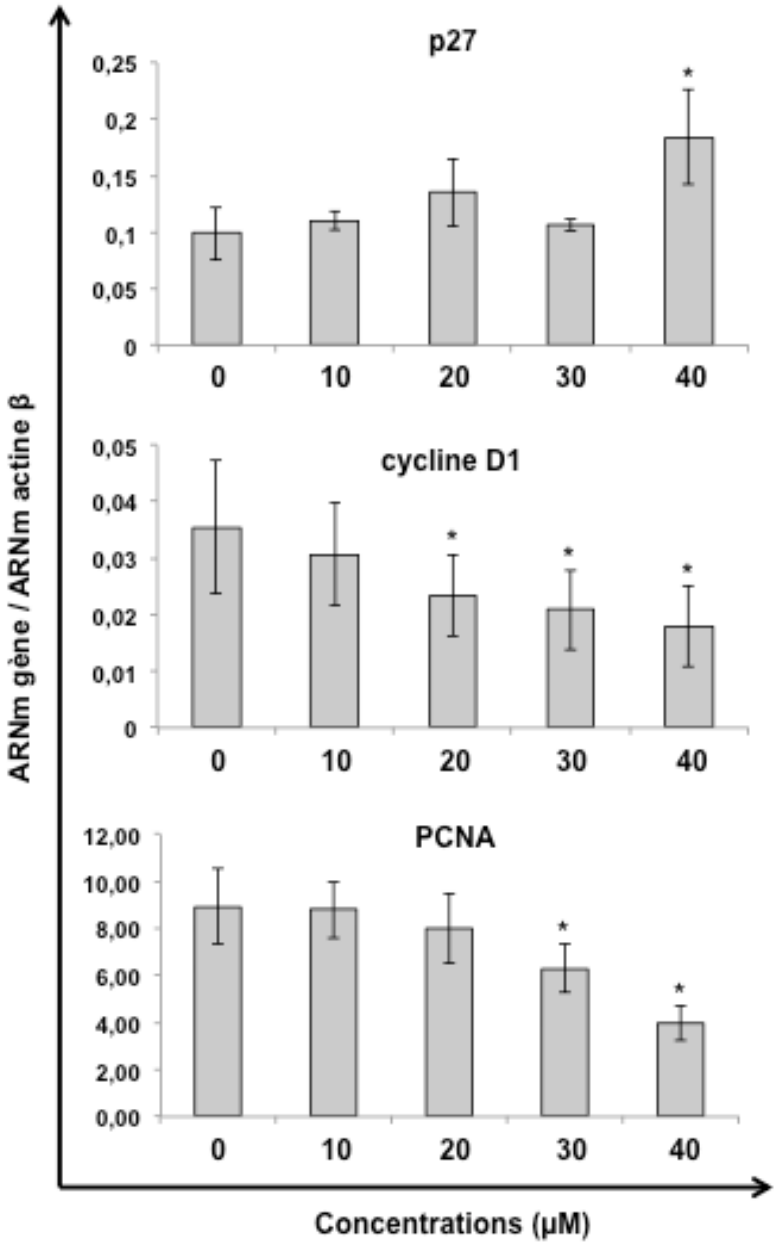


Figure 27 : Etude de l'expression des Cdki du cycle cellulaire dans la lignée U937 traitée avec le célécoxib.

L'expression des ARNm de p27, de la cycline D1 et de PCNA a été étudiée par PCR en temps réel. Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h par différentes concentrations de célécoxib (10-40µM). Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence (l'actine β). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). PCNA : proliferating cell nuclear antigen. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). * : $p < 0,05$

Tableau 8 : Récapitulatif des analyses de PCR en temps réel des acteurs de la transition G1/S du cycle cellulaire

Les PCR en temps réels que nous avons réalisées nous ont permis de trouver des éléments de comparaisons entre les cellules U937 et K562 qui pourraient expliquer pourquoi les inhibiteurs de COX-2 induisent une inhibition de la prolifération des cellules U937 mais pas des cellules K562. Ces facteurs sont p27, PCNA, cycline D1 et Rb. Le rôle de ces protéines est aussi montré au niveau du cycle cellulaire. + : augmentation ; - : diminution ; 0 : pas d'effet significatif ($p \leq 0,05$) ; **Ø :** pas encore analysé

	U937			**K562**	
	Nimésulide	**NS-398**	**Célécoxib**	**Nimésulide**	**NS-398**
p18	+	+	**Ø**	+	+
p19	+	+	**Ø**	+	+
p21	-	-	**Ø**	**0**	+
p27	+	+	+	**0**	**0**
PCNA	-	-	-	**0**	**0**
cycline D1	-	-	-	**0**	+
Rb	+	+	**Ø**	**0**	**0**

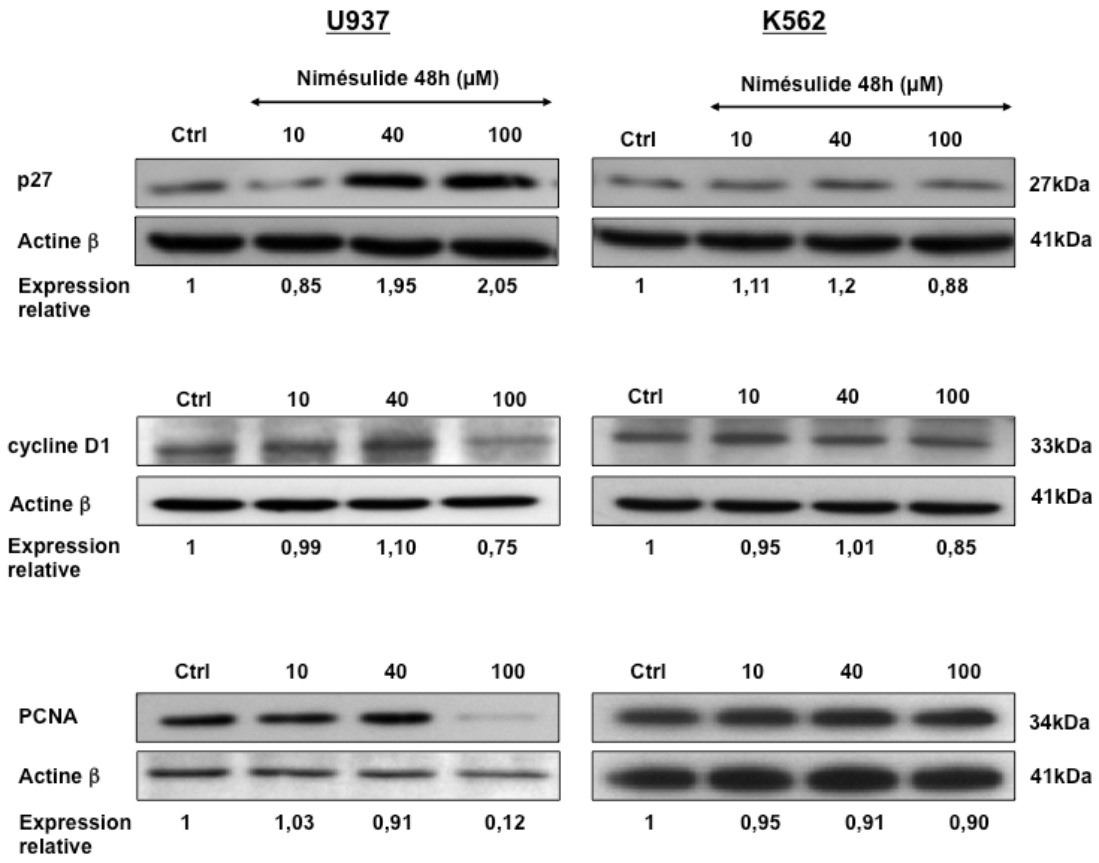


Figure 28 : Etude de l'expression de différents régulateurs de la transition G1/S du cycle cellulaire dans les lignées U937 et K562 traitées par le nimésulide.

L'expression de p27 (**A**), de la cycline D1 (**B**) et de PCNA (**C**) a été étudiée par Western Blot dans les cellules U937. Les cellules ont été traitées pendant 48h par différentes concentrations de nimésulide (10, 40 et 100µM). L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences similaires. Ctrl : Contrôle.

4.3.5 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de la protéine c-Myc

La cycline D1 est un acteur très précoce du cycle cellulaire dont l'expression est régulée par plusieurs oncogènes comme par exemple l'oncogène c-Myc qui se fixe sur le promoteur du gène de la cycline D1 pour initier sa transcription. Ces oncogènes régulent la transition G0/G1 du cycle cellulaire. Précédemment, nous avons observé une augmentation de l'expression de p27 au niveau de l'ARNm. Or c-Myc est aussi connu pour réprimer l'expression de p27 au niveau transcriptionnel (Yang *et al.* 2001). Afin d'étudier si l'expression de c-Myc est affectée par les inhibiteurs de COX-2, nous avons analysé le niveau d'expression de cette protéine par Western Blot (Figure 29). Nous avons pu observer que le nimésulide et le célécoxib induisent une diminution en fonction de la dose de l'expression de la protéine c-Myc. Un effet similaire a été observé pour les autres lignées cellulaires (Hel, Jurkat et Raji) après 24h de traitement avec le célécoxib. Le nimésulide n'affecte pas l'expression de c-Myc dans la lignée K562, même après 48h de traitement (Figure 29).

La diminution de l'expression de c-Myc peut être la conséquence d'une diminution de la stabilité de la protéine. En effet, c-Myc est connu pour sa demi-vie très courte d'environ trente minutes (Malempati, Tibbitts et al. 2006) et son expression est régulée par dégradation de la protéine *via* le protéasome 26S (Junttila and Westermarck 2008). D'après cette hypothèse, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique du protéasome 26S devrait prévenir la diminution de c-Myc induite par le nimésulide. Dans ce contexte, nous avons traité les cellules U937 pendant 1h par du MG132 (5µM), un inhibiteur de protéasome 26S puis nous avons traité les cellules pendant 1h, 2h et 4h par le nimésulide (100µM) (Figure 30). Nous avons ensuite étudié l'expression de la protéine c-Myc par Western Blot. L'étude nous montre que le MG132 seul augmente l'expression de c-Myc dès 1h de traitement, ce qui vérifie que c-Myc est bien régulé par dégradation *via* le protéasome 26S. Le nimésulide seul conduit à une diminution de l'expression de c-Myc dès 1h de traitement. Le co-traitement nimésulide/MG132 prévient cette diminution. Nos résultats montrent, d'une part que le protéasome est bien un facteur important dans la régulation de l'expression de c-Myc et d'autre part, suggèrent que le protéasome pourrait être impliqué dans la diminution de l'expression de c-Myc. Cependant, cette réversion pourrait aussi être la conséquence d'une compensation de l'effet induit par le nimésulide, par l'inhibition du protéasome.

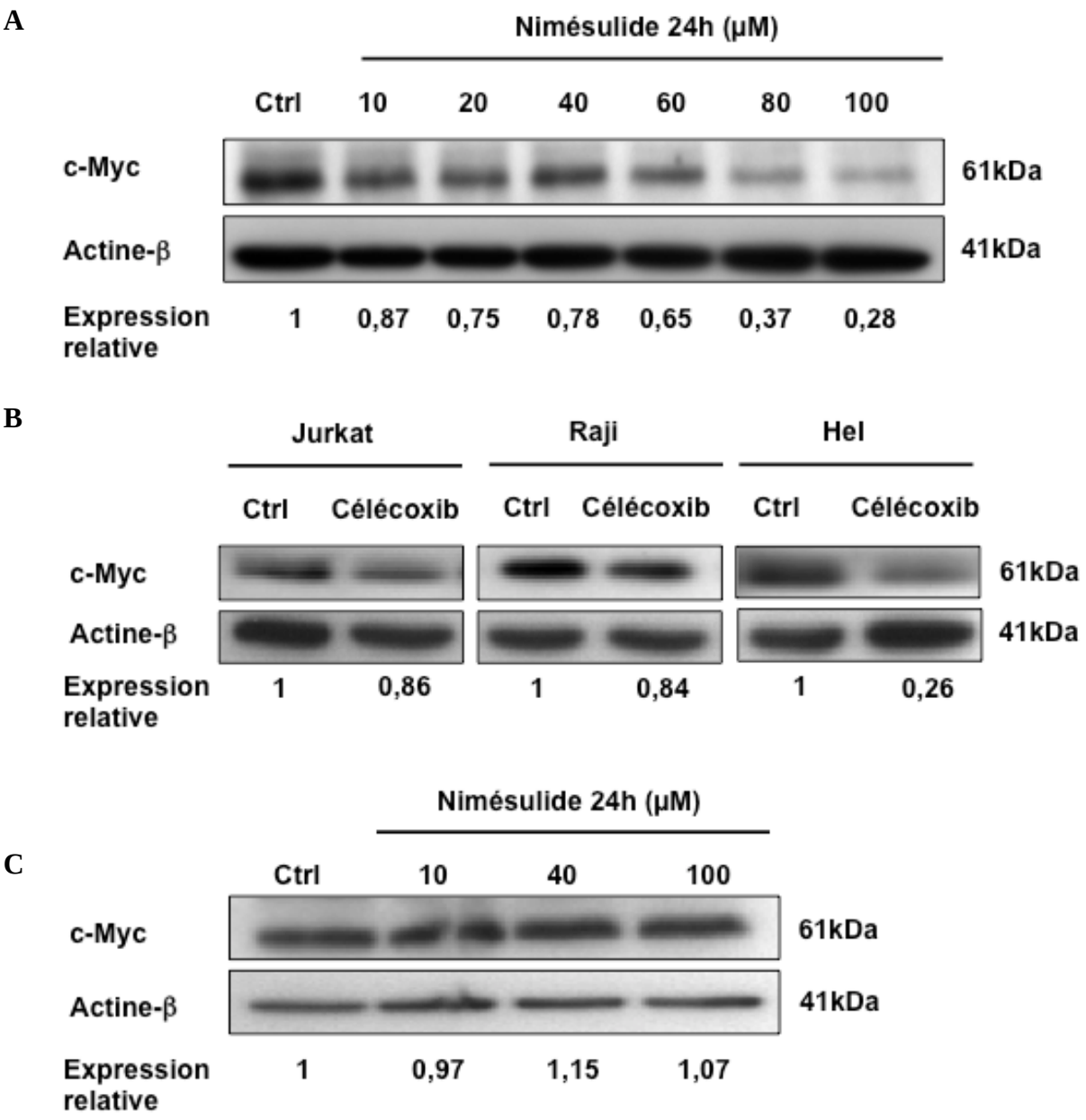


Figure 29 : Etude de l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de c-Myc dans les différentes lignées cellulaires

L'expression de c-Myc a été étudiée par Western Blot dans les cellules : U937 (**A**); Jurkat, Raji, Hel (**B**); ou K562 (**C**) traitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10-100µM). L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences similaires. Ctrl : Contrôle.

Par ailleurs, la diminution de l'expression de c-Myc après une heure de traitement nous a amenés à émettre l'hypothèse que les inhibiteurs de COX-2 sont capables de diminuer l'expression de c-Myc pour des temps encore plus courts. Dans ce contexte, nous avons traité les cellules U937 par le nimésulide pendant 5, 10, 20, 40 et 60 minutes. Nous avons ainsi observé une diminution du signal de c-Myc dès 5 minutes de traitement (Figure 31).

Afin de clairement identifier un effet sur la stabilité de la protéine c-Myc, nous avons utilisé le cycloheximide pour inhiber la traduction. Nous avons donc traité ou non les cellules U937 pendant 1h ou 24h par le nimésulide (100µM), puis par le cycloheximide (10µg/mL) pendant 5, 10, 20, 40 et 60 minutes. L'expression de c-Myc a ensuite été étudiée par Western Blot (Figure 33).

Pour l'expérience avec 1h de traitement par le nimésulide, le cycloheximide seul inhibe l'expression de c-Myc dès 5 min de traitement. La demi-vie de c-Myc est de 47,20 ± 6,68 minutes de traitement. Pour le co-traitement nimésulide/cycloheximide, nous n'avons pas observé de changements significatifs de la demi-vie de la protéine (36,61 ± 1,06 minutes) (Figure 32). Ces résultats indiquent que la diminution de l'expression de la protéine c-Myc n'est pas la conséquence d'une déstabilisation de la protéine.

L'expérience pour 24h de traitement (Figure 33) nous a montré que le cycloheximide seul inhibe l'expression de c-Myc dès 5 min de traitement. La demi-vie de c-Myc est de 43,69 ± 6,85 minutes de traitement. Pour le co-traitement nimésulide/cycloheximide, nous avons observé une stabilisation de la protéine (demi-vie de 60,13 ± 5,14 minutes). En effet, la diminution de l'expression de c-Myc est observable à partir de 40 minutes pour le nimésulide et 40 minutes pour le célécoxib. Notre étude montre ainsi que la diminution de l'expression de c-Myc induite par les inhibiteurs de COX-2 (nimésulide et célécoxib) n'est pas le résultat d'une déstabilisation de la protéine.

L'ensemble des résultats de cette partie suggère que la diminution de l'expression de c-Myc passe par un mécanisme de régulation du niveau d'ARNm (transcription et/ou stabilité de l'ARNm) ou de la traduction de la protéine.

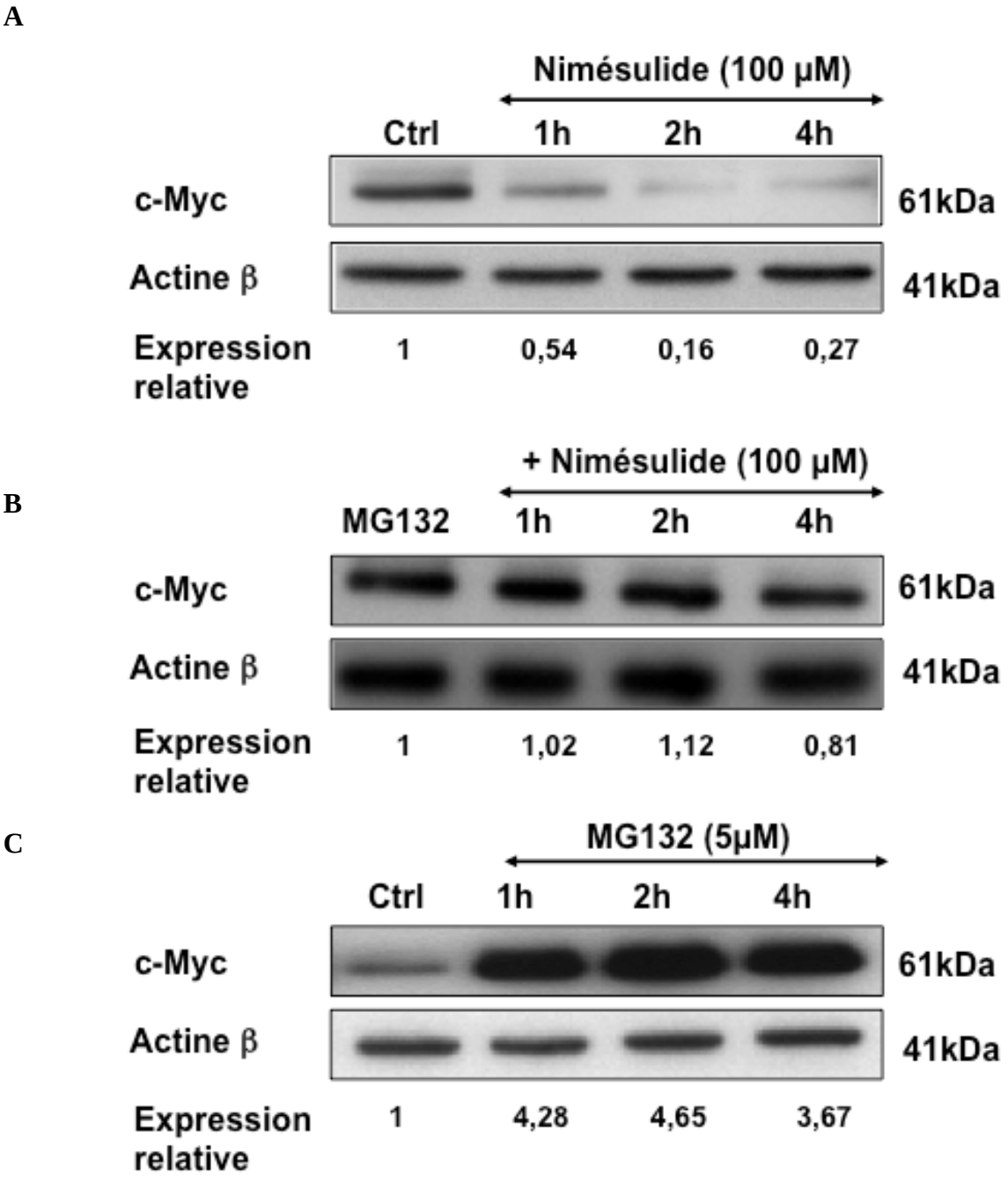


Figure 30 : Etude de l'implication du protéasome 26S dans la diminution de l'expression de c-Myc

L'expression de c-Myc a été étudiée par Western Blot dans les cellules U937 prétraitées ou non par du MG132 (5µM) pendant 1h, puis traitées pendant 1h, 2h et 4h par le nimésulide (100µM) (**A**). Les résultats du co-traitement MG132/ nimésulide sont représentés en **B.** L'effet du MG-132 seul est montré en **C.** L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences similaires. Ctrl : Contrôle ; Nime : nimésulide.

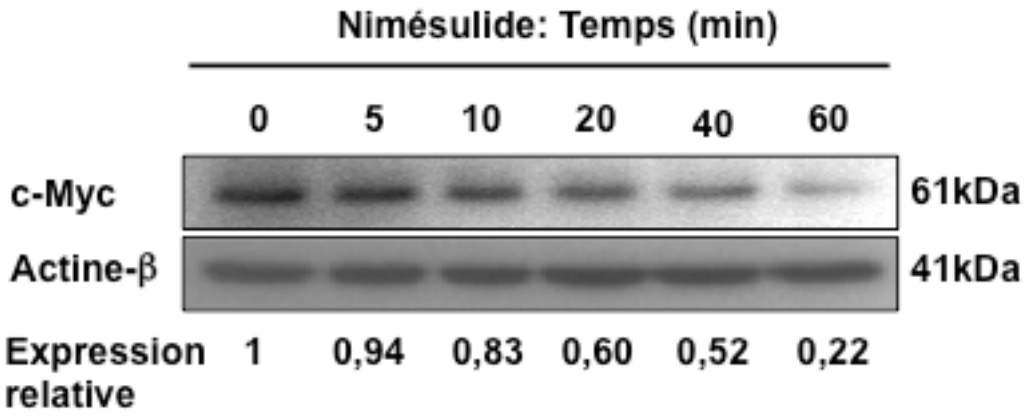
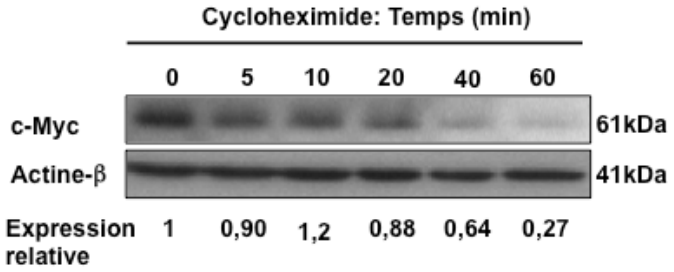


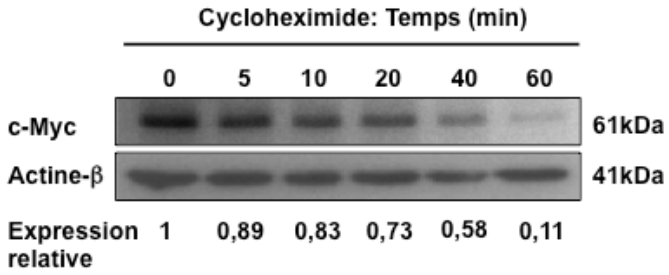
Figure 31 : Etude de l'effet du nimésulide sur l'expression de c-Myc

L'expression de c-Myc a été étudiée Western Blot dans les cellules U937 traitées pendant 1h par le nimésulide (100µM). L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences similaires. Ctrl : Contrôle ; Nime : nimésulide.

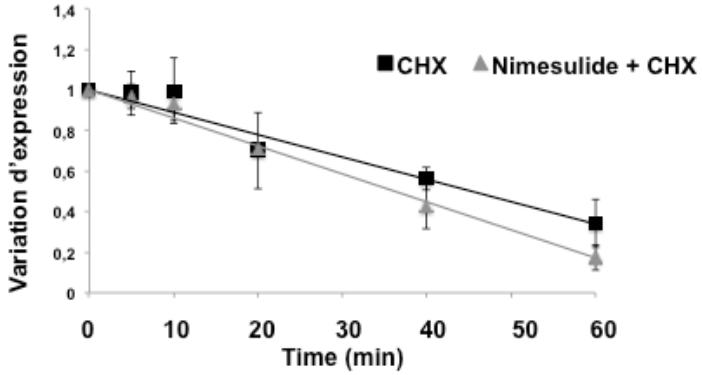
A



B



C

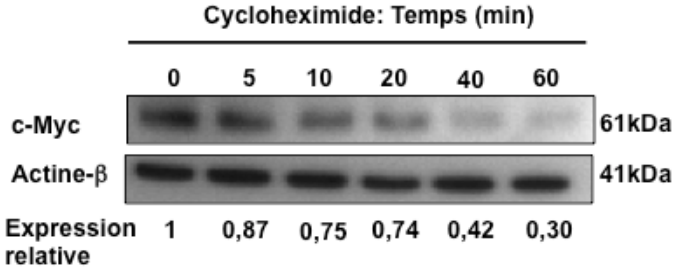


Echantillons	CHX	Nime + CHX
Demi-vie (min)	47,20 ± 6,68	36,61 ± 1,06

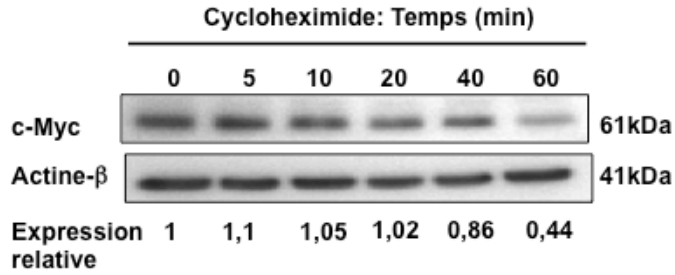
Figure 32 : Etude de l'expression et de la stabilité de la protéine c-Myc dans les lignées cellulaires U937 traitées par le nimésulide pendant 1h.

L'expression de c-Myc a été étudiée par Western Blot dans les cellules U937 traitées pendant 1h par le cycloheximide (10µg/mL) (**A**) ou pendant 1h par le nimésulide (100µM) puis 1h par le cycloheximide (10µg/mL) (**B**). Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence (actine-β). Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences similaires. Les demi-vie sont représentées en **C**. Ctrl : Contrôle ; Nime : nimésulide. * : $p < 0,05$.

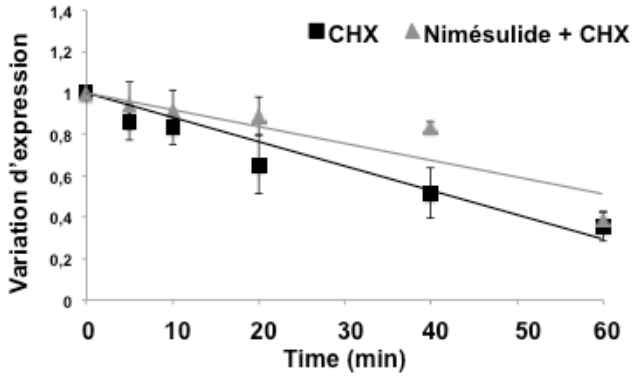
A



B



C



Echantillons	CHX	Nime + CHX
Demi-vie (min)	43,69 ± 6,85	60,13 ± 5,14

*

Figure 33 : Etude de l'expression et de la stabilité de la protéine c-Myc dans les lignées cellulaires U937 traitées par le nimésulide pendant 24h.

L'expression de c-Myc a été étudiée par Western Blot dans les cellules U937 traitées pendant 1h par le cycloheximide (10µg/mL) (**A**) ou pendant 24h par le nimésulide (100µM) puis 1h par le cycloheximide (10µg/mL) (**B**). Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence (actine-β). Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences similaires Les demi-vie sont représentées en **C**. Ctrl : Contrôle ; Nime : nimésulide. * : $p < 0,05$.

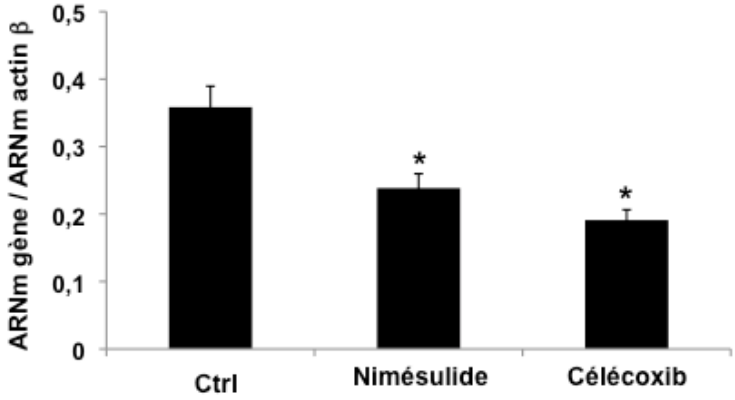
4.3.6 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression et la stabilité de l'ARNm de c-Myc

Nous avons tout d'abord étudié l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de c-Myc au niveau de l'ARNm par PCR en temps réel dans les cellules U937. L'analyse a été effectuée pour 1h et 24h de traitement (Figure 34). Après 1h heure de traitement par le nimésulide ou par le célécoxib, nous avons ainsi observé une diminution du niveau d'ARNm c-Myc (-33,12 ± 7,98% et -46,53 ± 0,04% respectivement). Le célécoxib a un effet plus important que le nimésulide. Cet effet peut être la conséquence d'une diminution de la transcription de c-Myc ou bien d'une déstabilisation de l'ARNm. Afin de clarifier cet aspect, nous avons étudié la stabilité de l'ARNm de c-Myc à l'aide de l'actinomycine D (Act D), un antibiotique qui a la capacité d'inhiber la transcription des ARNm. Les cellules U937 ont donc été traitées pendant 1h par du nimésulide (100µM) ou du célécoxib (40µM), puis par l'Act D pendant 10, 20, 40 et 60 minutes. L'expression de c-Myc a ensuite été analysée par PCR en temps réel. Les résultats nous montrent que la stabilité de l'ARNm de c-Myc n'est pas affectée significativement après 1h. En effet, le traitement par l'Act D engendre une demi-vie de l'ARNm de c-Myc de 36,7 ± 4,24 minutes. Pour les échantillons traités par le nimésulide ou par le célécoxib, les demi-vies sont respectivement de 39,49 ± 4,34 minutes et 43,19 ± 4,46 minutes. Ces données nous permettent de conclure qu'une diminution de la transcription de c-Myc est responsable de la diminution de l'ARNm après 1h de traitement (Figure 34),

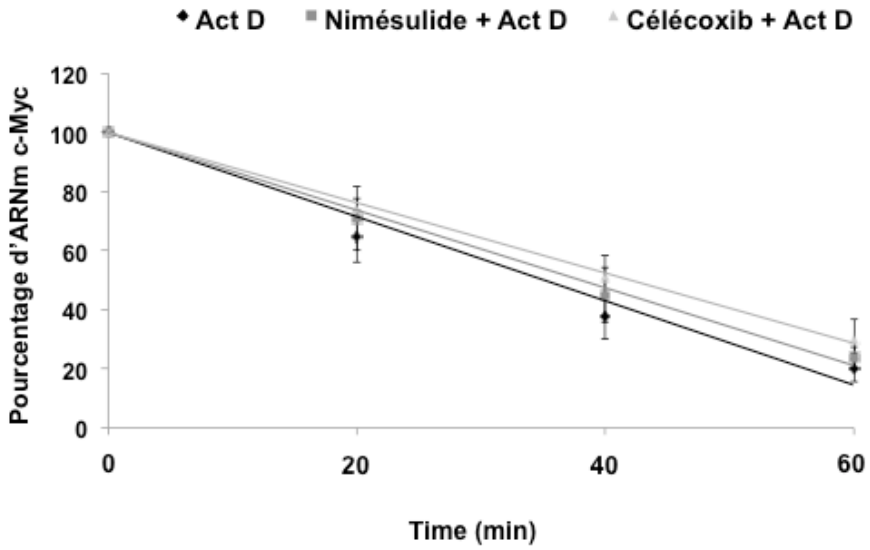
Concernant les traitements de 24h, nous avons constaté une induction de l'expression de l'ARNm suite au traitement par les trois inhibiteurs de COX-2 (Figure 35, Figure 36). L'augmentation est d'un facteur 1,42 ± 0,22 pour le nimésulide et 1,61 ± 0,20 pour le célécoxib. Des résultats similaires ont été obtenus avec le NS-398 (Figure 36) (induction de 1,90 ± 0,50 fois à 100µM après 24h). De même que précédemment, nous avons aussi étudié l'effet du nimésulide et du célécoxib sur la stabilité de l'ARN. Aucune modulation significative de c-Myc n'a été observée dans les cellules K562 traitées par le nimésulide ou par le NS-398 (Figure 37). Nos résultats suggèrent une augmentation de la transcription de c-Myc et suggèrent une inhibition de la traduction de la protéine par les inhibiteurs de COX-2.

Nos résultats nous ont permis d'identifier un effet bi-phasique des inhibiteurs de COX-2. Pour des temps de traitements courts (1h), nous observons une diminution de la transcription de c-Myc alors que pour les temps de traitement plus longs, les inhibiteurs pourraient exercer un effet sur la traduction de l'ARNm de c-Myc.

A



B

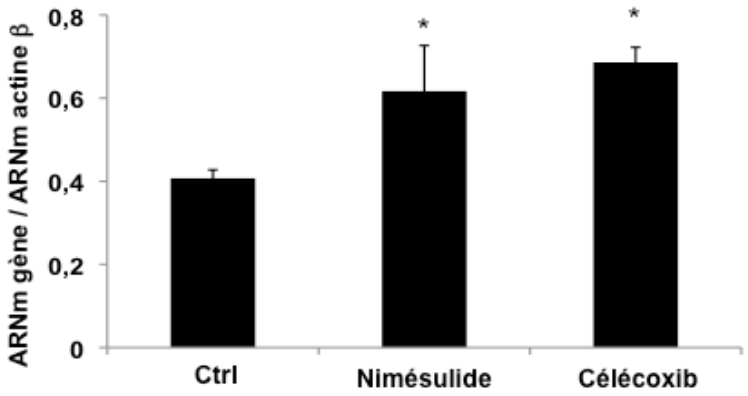


Samples	Ctrl	Nimésulide	Célécoxib
Half life (min)	36,7 ± 4,24	39,49 ± 4,34	43,19 ± 4,46

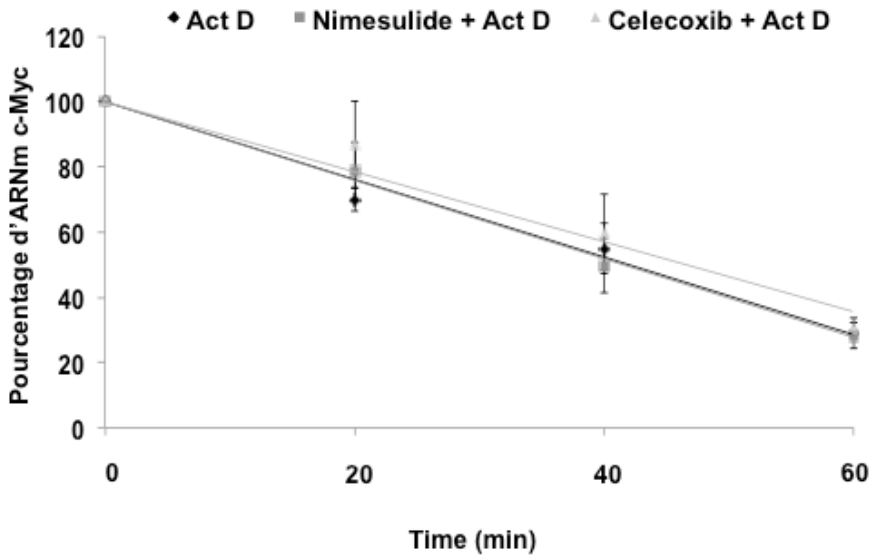
Figure 34 : Etude de l'expression et de la stabilité de l'ARNm de c-Myc dans les cellules U937 traitées pendant 1h avec le nimésulide ou le célécoxib.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 1h par le nimésulide (100µM) ou par le célécoxib (40µM). Le niveau d'expression de c-Myc a été étudié par PCR en temps réel (**A**). La stabilité de l'ARNm de c-Myc a été étudiée en traitant les cellules U937 par l'Act D durant 1h après traitement par le nimésulide ou le célécoxib. Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence (l'actine-β). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : Contrôle ; * : $p < 0,05$

A



B

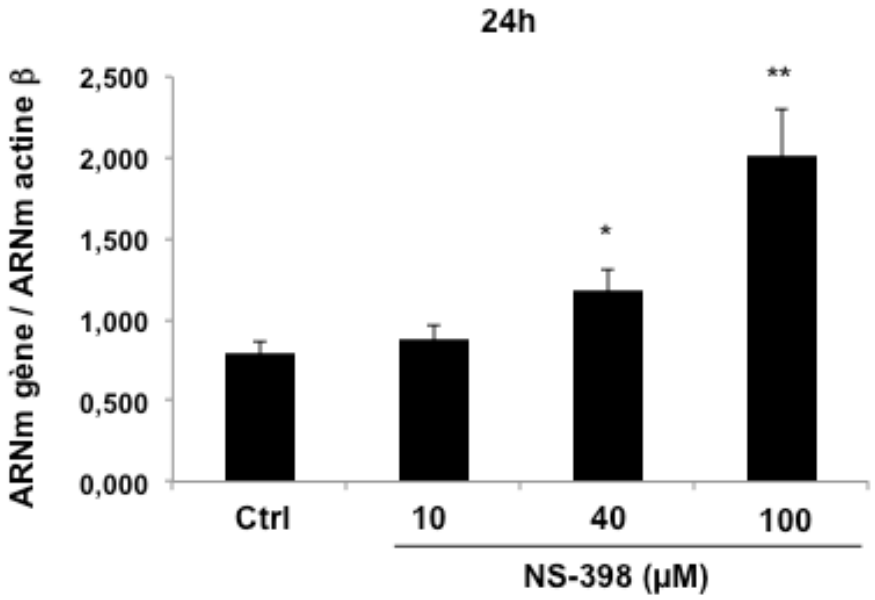


Samples	Ctrl	Nimésulide	Célécoxib
Half life (min)	42,04 ± 1,92	42,05 ± 5,06	47,4 ± 7,46

Figure 35 : Etude de l'expression et de la stabilité de l'ARNm de c-Myc dans les cellules U937 traitées par le nimésulide ou le célécoxib après 24h de traitement

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h par le nimésulide (100µM) ou par le célécoxib (40µM). Le niveau d'expression de c-Myc a été étudié par PCR en temps réel (**A**). La stabilité de l'ARNm de c-Myc a été étudiée en traitant les cellules U937 par l'Act D durant 1h après traitement par le nimésulide ou le célécoxib. Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence (l'actine-β). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : Contrôle ; * : $p < 0,05$.

A



B

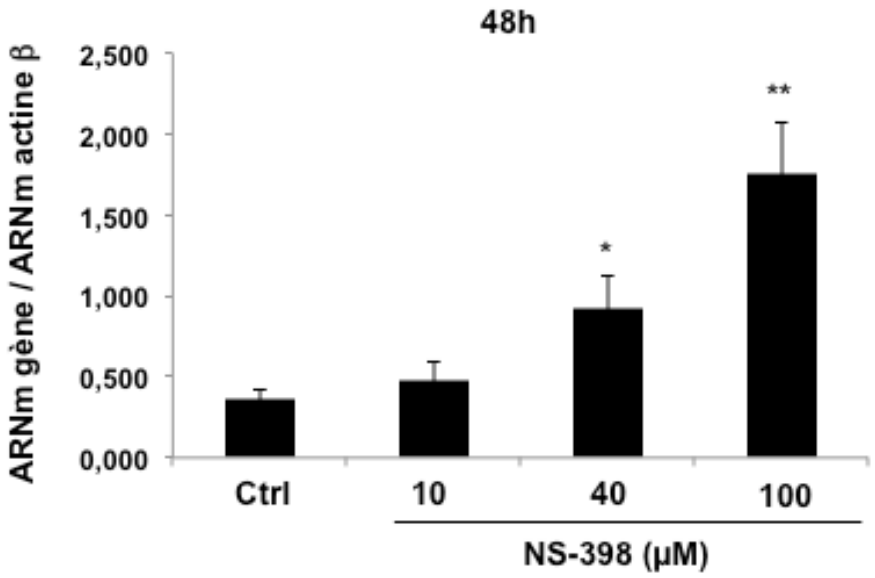


Figure 36 : Etude de l'expression de l'ARNm de c-Myc dans les cellules U937 traitées par le NS-398 après 24h et 48h de traitement

L'expression de c-Myc a été étudiée par Western Blot dans les cellules U937 traitées pendant 24h (**A**) ou 48h (**B**) par du NS-398 (10-100µM). Le niveau d'expression de c-Myc a été étudié par PCR en temps réel. Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence (l'actine-β). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : Contrôle. * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

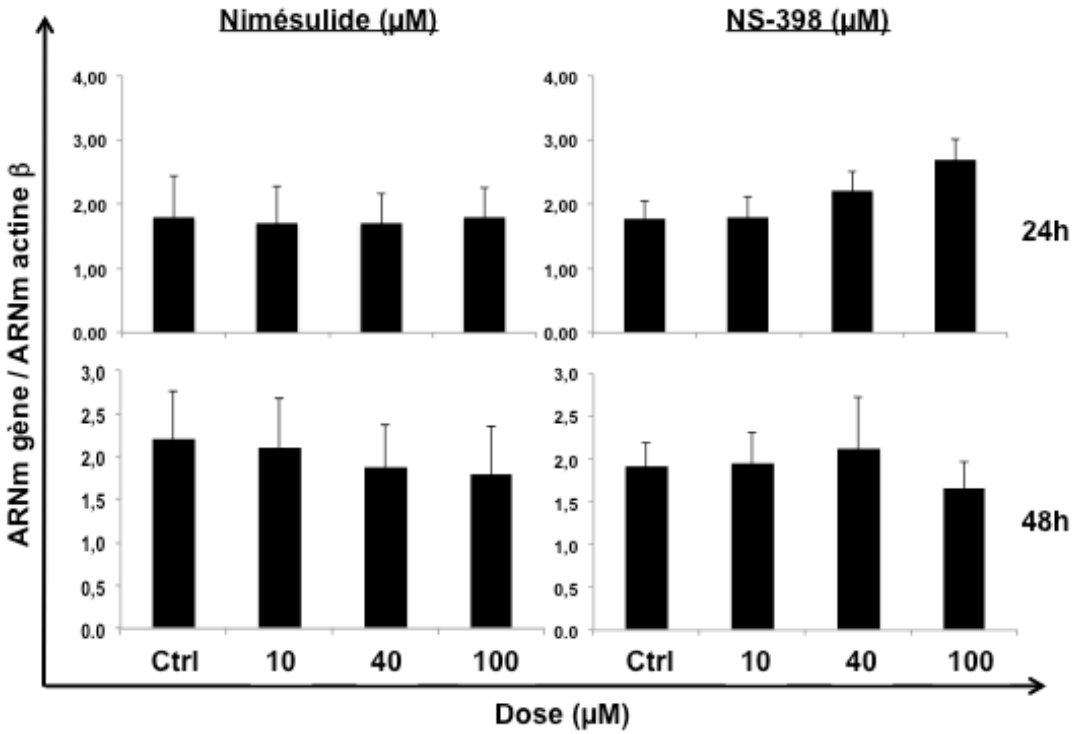


Figure 37 : Etude de l'expression de c-Myc dans les lignées cellules K562 traitées par les différents inhibiteurs de COX-2.

L'expression de c-Myc a été étudiée par PCR en temps réel dans les cellules K562 traitées pendant 48h par du nimésulide (100µM) ou par du NS-398 (40µM). Le niveau d'expression de c-Myc a été étudié par PCR en temps réel. Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence (l'actine-β). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : Contrôle.

4.3.7 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur la phosphorylation de ERK1/2 et de p38 MAPK

Les résultats obtenus après 1h de traitement nous ont permis d'émettre l'hypothèse que la transcription de c-Myc est diminuée. Parmi les voies de signalisation intracellulaires régulant la transcription de c-Myc, la voie ERK et p38MAPK joue un rôle important (Chen *et al.* 2006). Par conséquent, nous avons étudié la phosphorylation de ces deux protéines par Western Blot dans les cellules U937 traitées pendant 5, 10, 20, 40 et 60 minutes par le nimésulide (100µM).

Les résultats nous montrent une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 dès 5 min de traitement par le nimésulide (100µM). Nous avons utilisé le PD98059, un inhibiteur de ERK1/2 comme contrôle négatif (25µM pendant 1h). L'inhibiteur de ERK1/2 conduit par ailleurs à une diminution de l'expression de c-Myc, ce qui montre bien l'importance de cette voie pour l'expression de cet oncogène. La diminution de ERK1/2 précède la diminution de l'expression de c-Myc (Figure 38).

Concernant la protéine p38, l'inhibiteur de p38 (SB203580) conduit à une diminution de la phosphorylation de p38 et à une diminution de l'expression de c-Myc (Figure 38), ce qui démontre bien que la protéine p38 joue un rôle important dans l'expression de c-Myc. Cependant, aucune modification de la phosphorylation n'a été observée avec les échantillons traités par le nimésulide. La diminution de l'expression de c-Myc par le nimésulide n'est donc pas la conséquence d'une modulation de la voie p38MAPK.

Nos résultats montrent que la diminution de l'expression de c-Myc induite par le nimésulide passe par une diminution de la transcription de c-Myc et est associée à une diminution de la phosphorylation de ERK1/2, une voie régulatrice de la transcription de c-Myc.

4.3.8 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de microARNs

Les données précédentes nous ont suggéré un effet sur la traduction de l'ARNm c-Myc après 24h de traitement avec le nimésulide. L'ARNm qui code c-Myc contient un élément ARE (AU-rich element) dans la région 3'NT (Jones *et al.* 1987). Cet élément est la cible de miRs et de protéines qui régulent la traduction et/ou la stabilité de l'ARN.

Nous avons dans un premier temps étudié les miRs connus pour réguler la traduction de c-Myc. A l'aide des données de la littérature et de la base de donnée « Target Scan », nous avons, dans un premier temps, sélectionné les miRs pouvant cibler l'ARNm c-Myc (Figure 39). Nous avons ainsi pu identifier un certain nombre de miRs pouvant se fixer sur l'ARNm de c-Myc. L'implication de certains de certains miRs dans la régulation de la stabilité ou de la traduction de l'ARNm de c-Myc a déjà été montrée dans la littérature. C'est notamment le cas de miR-34a et des miRs de la famille Let-7 (Buechner, Tomte et al. 2011; Wong, Man et al. 2011).

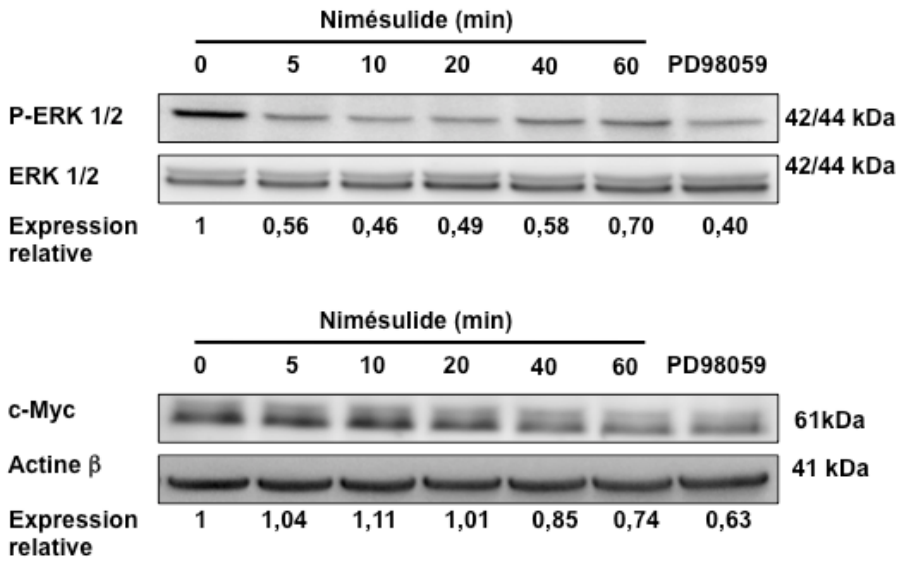
Ainsi, l'expression de miR-34a et des miRs de la famille Let-7 a été analysée par PCR en temps réel après 24h de traitement par le nimésulide ou le célécoxib. L'analyse n'a montré aucune modulation significative de l'expression de miR-34a. Cependant, nous avons montré une augmentation en fonction de la dose des miRs Let-7c et Let-7f avec le nimésulide et le célécoxib. Pour Let-7c, la différence est significative pour 100µM de nimésulide et 10µM de célécoxib. Pour Let-7f, la différence est significative dès 10µM de nimésulide et de célécoxib.

Nos résultats suggèrent que la traduction de c-Myc est inhibée par les inhibiteurs de COX-2. Notre hypothèse est associée à une augmentation de l'expression de Let-7c et de Let-7f, deux miRs qui se fixent sur la région 3'NT de l'ARNm de c-Myc.

4.3.9 Etude de l'expression de COX-2 et de la synthèse de PGE2 après traitement par les inhibiteurs de COX-2

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il existe plusieurs isoformes de COXs. Nous avons aussi remarqué que la lignée cellulaire K562 était la plus résistante aux inhibiteurs de COX-2. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette résistance pourrait s'expliquer par des taux d'expression différentiels de COX-2 dans les différentes lignées cellulaires étudiées. Dans ce contexte, nous avons évalué l'expression de COX-1 et de COX-2 dans les lignées cellulaires Hel, Jurkat, K562, Raji et U937 par PCR en temps réel (Figure 41). Toutes les lignées expriment fortement COX-1. Pour COX-2, le niveau d'expression dans la lignée K562 est le plus faible. L'expression de COX-2 a ensuite été évaluée au niveau protéique par Western Blot (Figure 41).

A



B

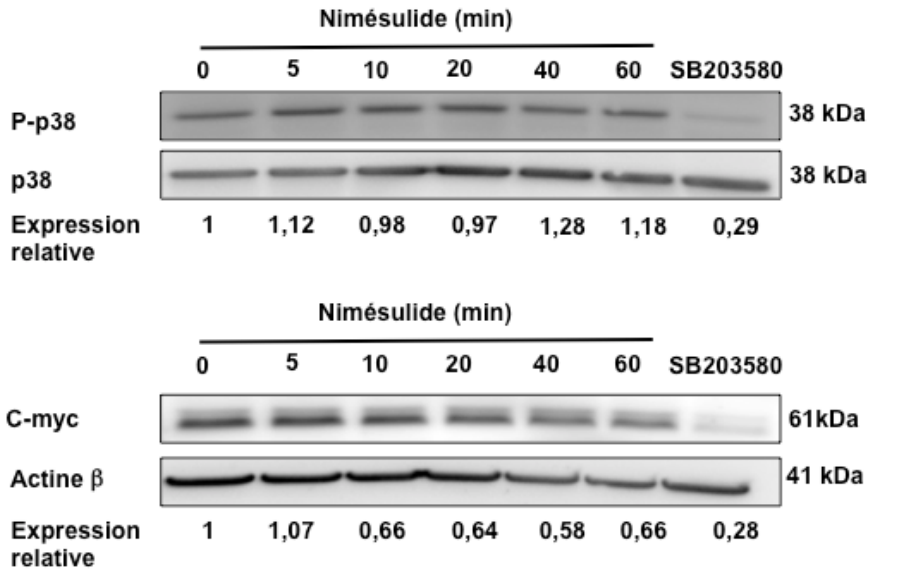
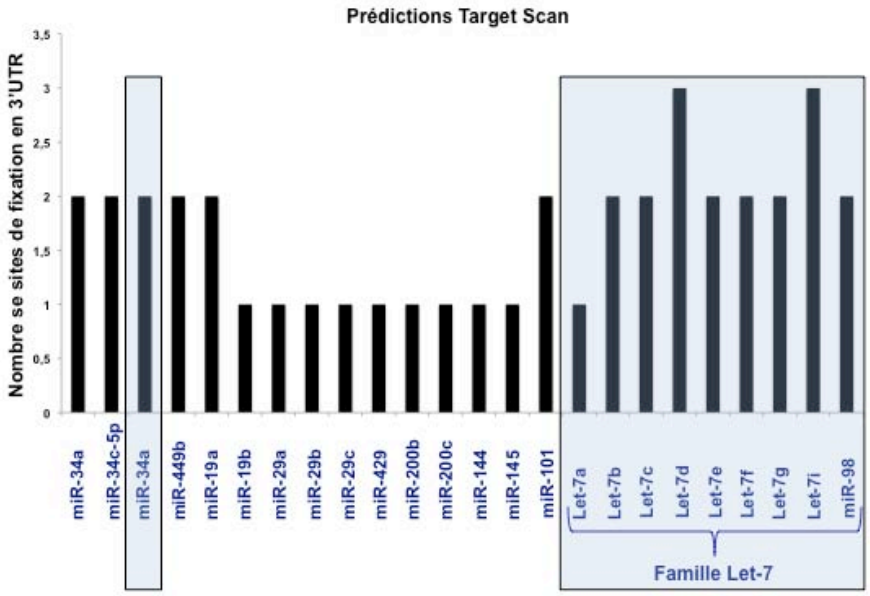


Figure 38 : Etude de la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules U937 traitées par le nimésulide.

La phosphorylation de ERK1/2 a été étudiée par Western Blot dans les cellules U937 traitée pendant 1h par du nimésulide (**A**). Le PD98059, un inhibiteur spécifique de ERK a été utilisé comme contrôle négatif (25µM pendant 1h). Le profil de phosphorylation de ERK1/2 a été normalisé par l'expression totale de ERK1/2. Les membranes ont ensuite été ré-hybridées avec un anticorps pour c-Myc (**B**). Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires.

A



B

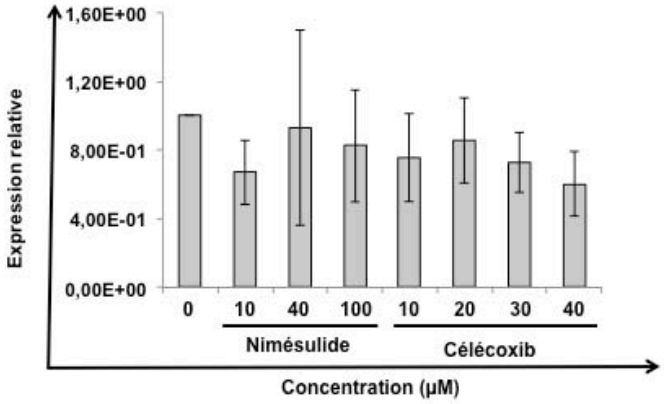


Figure 39 : Etude des miRs pouvant potentiellement se fixer sur la région 3'NT de l'ARNm c-Myc par l'algorithme « TargetScan ».

Plusieurs miRs ont la capacité de se fixer dans la région 3'NT de l'ARNm de c-Myc. Ces miRs contrôlent ainsi la stabilité de l'ARNm cible ou sa traduction. L'algorithme « TargetScan » (http://www.targetscan.org/) nous a permis d'identifier un certain nombre de miRs pouvant se fixer potentiellement en région 3'NT de c-Myc (**A**). Les miRs ayant prouvé cet effet dans la littérature sont encadré en bleu. **B**, L'expression de miR-34a a été étudiée par PCR en temps réel. Les cellules U937 ont été traitées pendant 48h par différentes concentrations de nimésulide (10, 40 et 100 µM) ou de célécoxib (10-40µM). Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence (RNA, U6B small nuclear ; RNU6B). Les valeurs ont ensuite été normalisées par les valeurs des échantillons non traitées. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard).

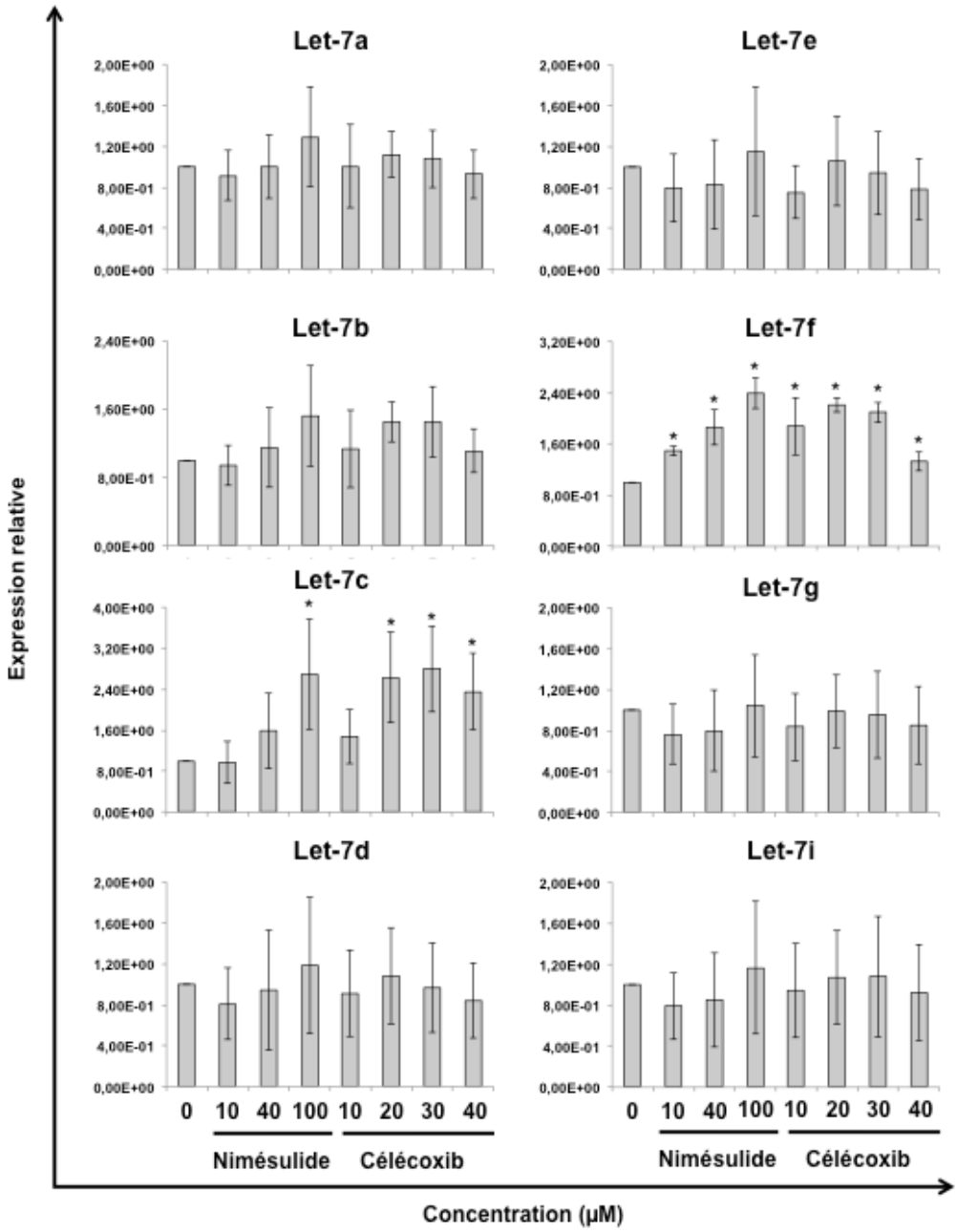
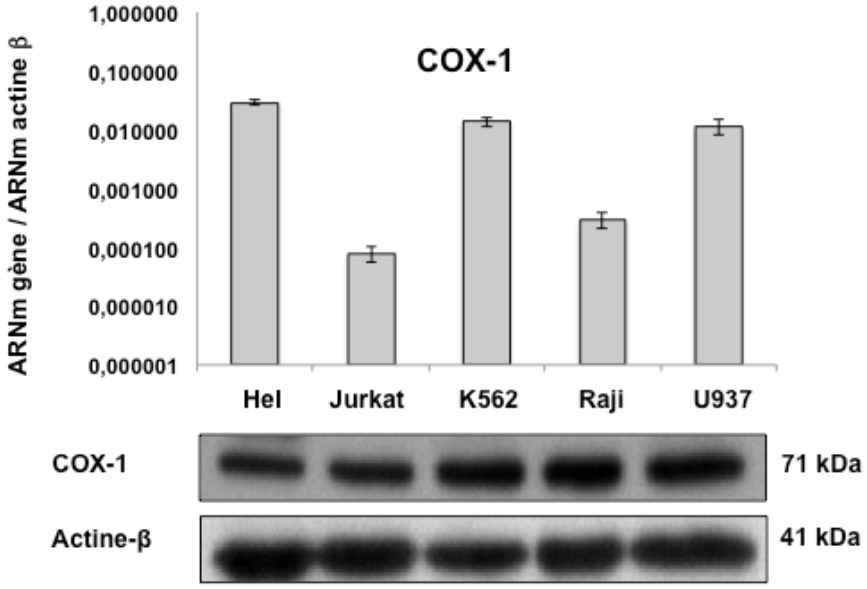


Figure 40 : Effet du nimésulide et du célécoxib sur l'expression de miRs de la famille Let-7

L'expression des miRs de la famille Let-7 a été étudiée par PCR en temps réel. Les cellules U937 ont été traitées pendant 48h par différentes concentrations de nimésulide (10-100 µM) ou de célécoxib (10-40µM). Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence (RNA, U6B small nuclear ; RNU6B). Les valeurs ont ensuite été normalisées par les valeurs des échantillons non traitées * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard).

A



B

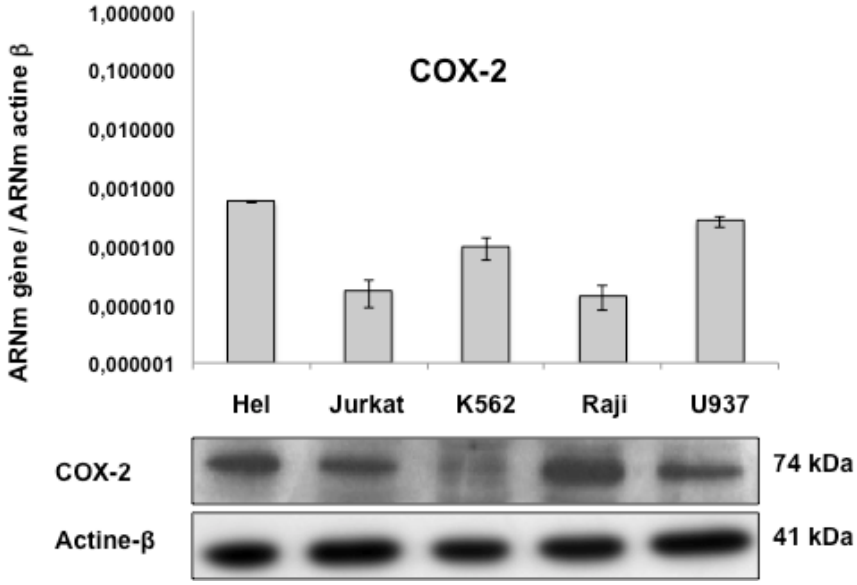
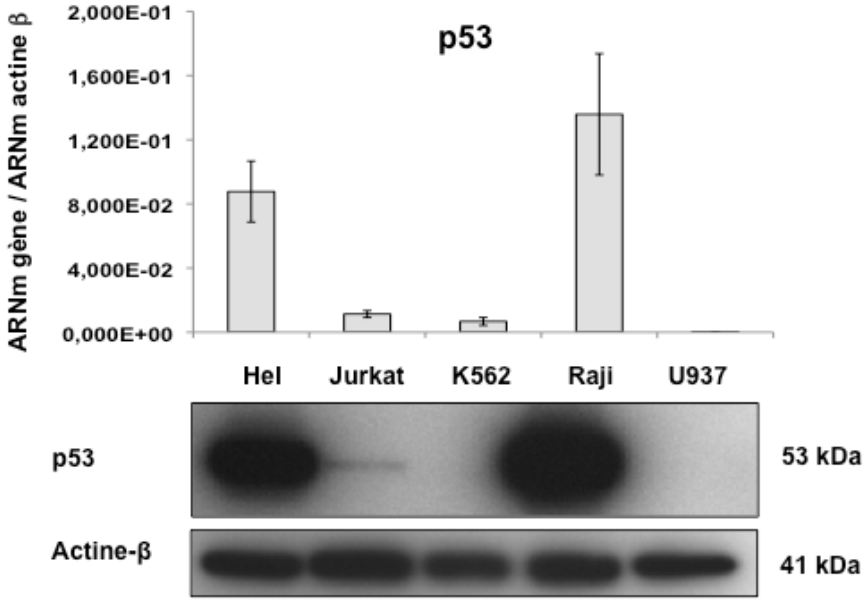


Figure 41 : Evaluation de l'expression de COX-1 et de COX-2

L'expression de COX-1 (**A**) et de COX-2 (**B**) a été évaluée dans les lignées cellulaires Hel, Jurkat, K562, Raji et U937 au niveau de l'ARNm par PCR en temps réel et au niveau protéique par Western Blot. Les expressions sont normalisées par un gène de référence (l'actine-β). Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence. Les résultats montrés sont représentatifs de cinq expériences similaires.

A



B

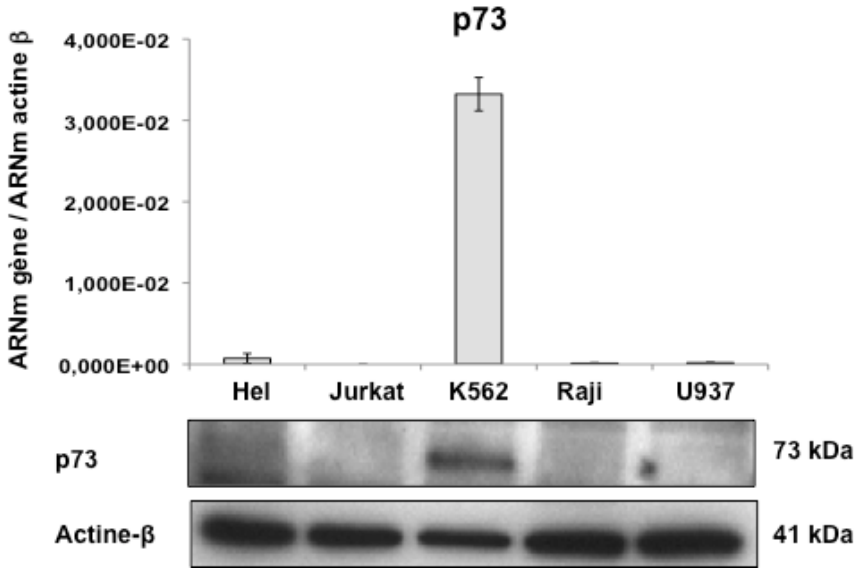


Figure 42 : Evaluation de l'expression de p53 et de p73

L'expression de p53 (**A**) et p73 (**B**) a été évaluée dans les lignées cellulaires Hel, Jurkat, K562, Raji et U937 au niveau de l'ARNm par PCR en temps réel et au niveau protéique par Western Blot. Les expressions sont normalisées par rapport à un gène de référence (l'actine-β). Les résultats de PCR représentent la différence relative de la quantité de transcrit du gène cible par rapport à la quantité de transcrit du gène de référence. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences similaires.

Nous avons ainsi constaté que la protéine COX-2 est exprimée dans les lignées cellulaires Hel, Jurkat, Raji et U937 mais presque absente dans la lignée K562. Ces données démontrent une bonne corrélation entre l'expression de COX-2 et la sensibilité des différentes lignées cellulaires aux inhibiteurs de COX-2. La même analyse a été réalisée pour les protéines p53 et p73 qui sont aussi impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Agarwal, Agarwal et al. 1995). Nos résultats n'ont révélé cependant aucune corrélation avec la sensibilité des lignées cellulaires aux inhibiteurs de COX-2 (Figure 42). Ces données suggèrent donc que les inhibiteurs de COX-2 génèrent un effet qui dépend de COX-2.

Les effets de COX-2 sur la prolifération cellulaire sont en partie la conséquence d'une production de PGE2 qui possèdent la capacité de transactiver ERK1/2 (Pai *et al.* 2002 ; Yu *et al.* 2009) et qui peuvent de ce fait contrôler l'expression de c-Myc. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle l'effet des inhibiteurs dépend de COX-2. Dans ce cas, l'administration de PGE2 exogène pourrait contrecarrer la diminution de l'expression de c-Myc induite par les inhibiteurs de COX-2. Les cellules U937 ont donc été prétraitées pendant 1h avec différentes concentrations de PGE2 (10pM-50nM) avant incubation avec du nimésulide (100µM). Puis l'expression de c-Myc a été étudiée par Western blot (Figure 43). Nous avons cependant constaté que la diminution de l'expression de c-Myc induite par le nimésulide est maintenue en présence de PGE2.

Ces résultats sont renforcés par l'étude de la production de PGE2 par les cellules par ELISA (Figure 44). En effet, l'analyse a démontré que la synthèse de PGE2 dans les cellules U937 est très faible, suggérant une faible activité enzymatique. De plus, la production de PGE2 n'est pas altérée par le traitement avec les différents inhibiteurs de COX-2 pour la lignée U937 et K562. En guise de contrôle positif pour le test ELISA, nous avons utilisé les cellules K562 traitées par du PMA (160nM) pendant 24h. Comme attendu, une augmentation très significative ($p \leq 0{,}001$) de la production de PGE2 a été observée (+ 97,45 ± 17,11 pg/mL).

En conclusion, nos résultats suggèrent donc que malgré une bonne corrélation entre l'expression de COX-2 et la sensibilité des différentes lignées cellulaires aux inhibiteurs de COX-2, la diminution de l'expression de c-Myc par ces mêmes inhibiteurs est indépendante de la synthèse de PGE2, donc de l'activité enzymatique de COX-2.

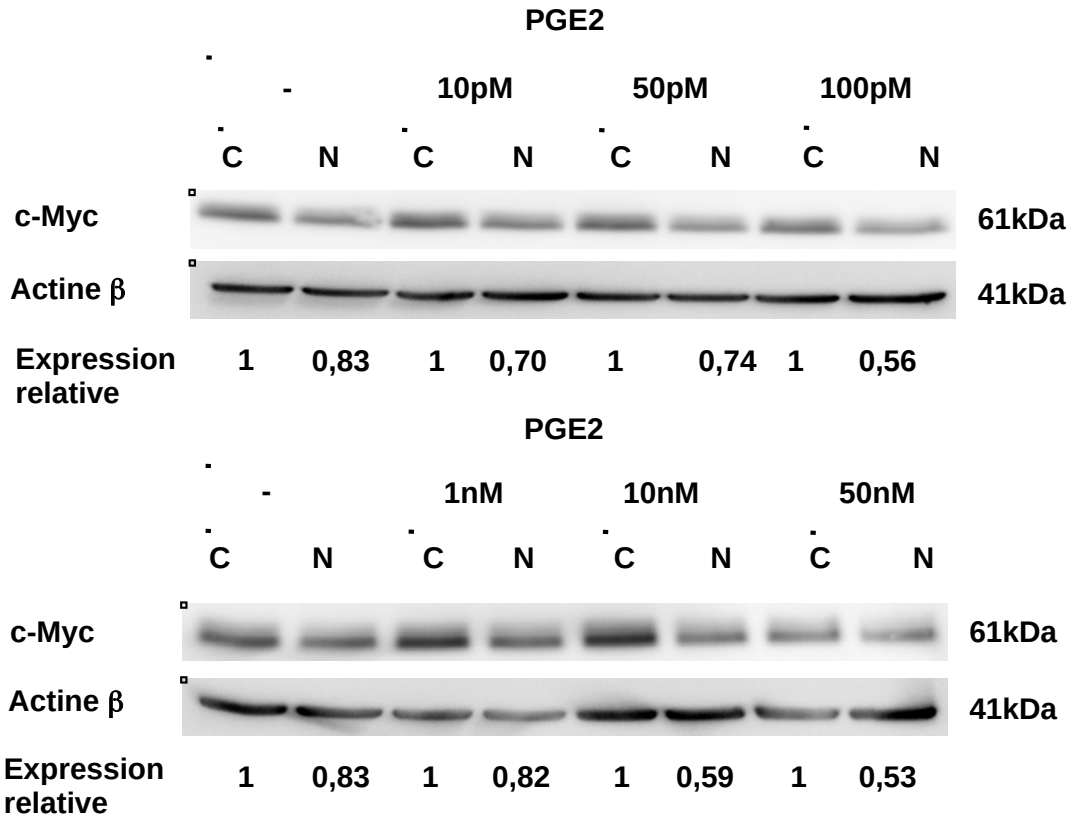
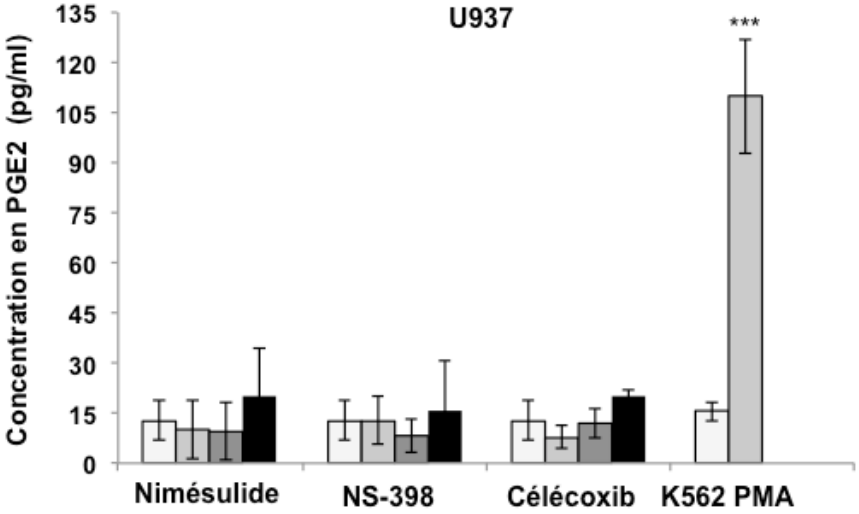


Figure 43 : Etude de l'effet des prostaglandines E2 sur l'inhibition de l'expression de c-Myc induite par le nimésulide

Les cellules U937 ont été traitées pendant 1h par différentes concentrations de PGE2, puis traitées pendant 1h par le nimésulide (100µM). L'expression de la protéine c-Myc a ensuite été évaluée par Western Blot. Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires. C : contrôle ; N : nimésulide

A



B

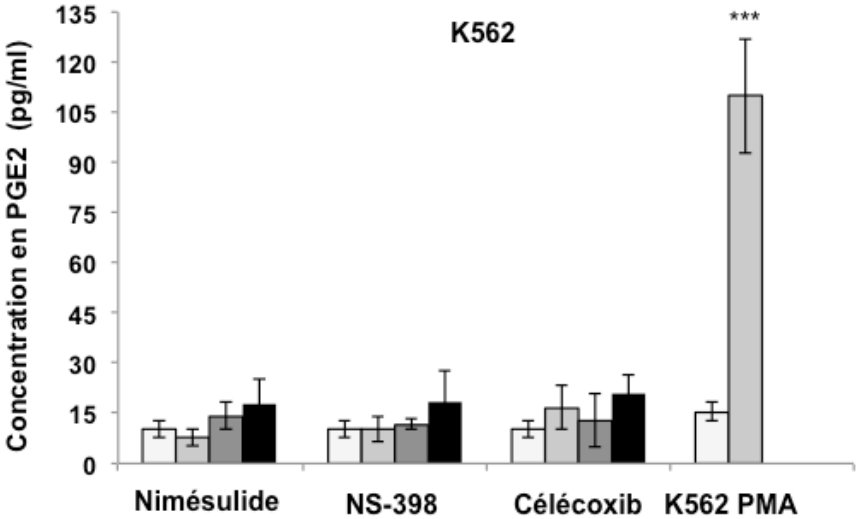


Figure 44 : Etude de l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur la synthèse de prostaglandines E2

Les cellules U937 (**A**) et K562 (**B**) ont été traitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10-100µM), de NS-398 (10-100µM) ou de célécoxib (10-40µM). La concentration en PGE2 dans le surnageant des échantillons a ensuite été évaluée par ELISA. Les concentrations sont exprimées en pg/mL pour 1 million de cellules. Les cellules K562 traitées par 160nM de PMA pendant 24h ont été utilisées comme contrôle positif. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard).

* : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

4.3.10 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de marqueurs de différentiation myéloïde

L'expression de c-Myc est associée au maintien d'un état indifférencié dans les cellules tumorales (Pedrazzoli *et al.* 1989; Hoffman, Amanullah et al. 2002). Par ailleurs, l'accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire est une caractéristique des cellules en cours de différenciation (Furukawa 1997). Nos résultats sont compatibles avec ce modèle et donc à l'établissement d'un état plus différencié des cellules U937 traitées par les inhibiteurs de COX-2.

Les cellules pro-myéloïdes U937 possèdent la capacité de se différentier en monocytes ou en granulocytes. L'expression de marqueurs myéloïdes a été évaluée dans ces cellules traitées par le nimésulide ou par le célécoxib. Les marqueurs CD11b et CD14 qui sont majoritairement exprimés par les monocytes (Simmons *et al.* 1989; Kirkland *et al.* 1998) et CD15 qui est préférentiellement exprimé par les granulocytes (Nakayama *et al.* 2001) ont ainsi été étudiés par cytométrie en flux (Figure 45). A partir de 10µM de nimésulide ou de célécoxib, une augmentation dépendante de la dose de CD15 a été observée après 48h de traitement dans les cellules U937. L'augmentation du signal atteint 175,99 ± 63,83 % pour la concentration maximale en nimésulide et 151,12 ± 75,03 % pour 40µM de célécoxib. Aucune modification de l'expression de CD11b ou de CD14 n'a été observée (Figure 45), même pour des temps de traitement plus longs comme 72h. Seul le célécoxib à la concentration de 40µM inhibe légèrement l'expression de CD11b. Ces données suggèrent donc l'acquisition de caractéristiques granulocytiques pour les cellules U937.

Les cellules qui se différencient s'accumulent en phase G0 du cycle cellulaire et deviennent de ce fait quiescentes (Ketley, Allen et al. 2000). Afin de savoir si nos cellules sont en phase G0 du cycle cellulaire, nous avons étudié l'expression de la protéine Ki-67, une protéine dont la fonction n'est pas encore précisément connue mais est présente dans le noyau de cellules qui prolifèrent et qui est absente dans les cellules quiescentes et sénescentes (Schluter, Duchrow et al. 1993). Nous avons étudié l'expression de cette protéine dans les cellules U937 traitées par le nimésulide ou le célécoxib par microscopie à fluorescence et par cytométrie en flux (Figure 46). Une augmentation significative du nombre de cellules n'exprimant pas Ki-67 a été observée, montrant qu'une partie des cellules s'accumulent en phase G0 du cycle cellulaire après traitement par les inhibiteurs de COX-2. Le pourcentage de cellules n'exprimant pas Ki-67 atteint 21,13 ± 3,56% à 100µM de nimésulide et 20,42 ± 3,93% pour 40µM de célécoxib. Ces résultats sont compatibles avec une accumulation des

cellules en phase G0 du cycle cellulaire. L'inhibition de la prolifération cellulaire, associée à une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire sont des caractéristiques retrouvées aussi lors d'une induction de la sénescence cellulaire (Kurz, Decary et al. 2000; Lleonart *et al.* 2009). La sénescence cellulaire étant associée à une augmentation de la masse lysosomiale (Kurz, Decary et al. 2000), une augmentation de l'activité β-gal peut donc être observée (Gerland *et al.* 2003). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'activité β-gal des cellules U937 traitées pendant 48h par du nimésulide (100µM) et par du célécoxib (40µM). Nous avons aussi utilisé les cellules K562 traitées par de la doxorubicine (80nM) pendant 24h comme contrôle positif de sénescence (Figure 47). Nous avons ainsi observé que dans le contrôle positif, la taille des cellules augmente et que les cellules présentent une zone colorée en bleu qui témoigne de l'activité β-gal. Pour les cellules U937 traitées par les inhibiteurs de COX-2, nous avons aussi observé des vésicules positives pour la β-gal. Ces vacuoles sont absentes dans les cellules non traitées et témoignent d'une augmentation de la masse lysosomiale mais ne correspondent pas à la morphologie de cellules sénescentes comme nous l'avons observé avec les cellules K562 traitées à la doxorubicine.

La différenciation cellulaire est un processus qui conduit à des changements morphologiques importants des cellules. Afin de vérifier si des changements morphologiques interviennent dans les cellules U937 traitées par nimésulide ou par célécoxib, nous avons observé la morphologie de ces cellules à l'aide d'une coloration de May-Grünwald Giemsa (Figure 48). L'observation des cellules n'a cependant pas montré de changement morphologique correspondant à une différenciation terminale. Seule une accumulation de petites vacuoles blanches périnucléaires a peu être observée. Notre hypothèse est que les inhibiteurs de COX-2 conduisent à un état plus différencié des cellules U937, vers la voie granulocytaire, sans atteindre un stade de différenciation terminale.

Nous avons ensuite vérifié un effet possible des inhibiteurs de COX-2 sur la différenciation des cellules K562 et Hel. Ces deux lignées cellulaires sont capables de se différencier en mégacaryocytes et érythrocytes. Ainsi, dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de CD41a et CD61, deux marqueurs des mégacaryocytes (Hassan and Freund 1995). Dans la lignée Hel, une augmentation de l'expression de ces deux marqueurs a été observée à partir de 72h de traitement avec du nimésulide ou du célécoxib (Figure 49). Les cellules K562 par contre sont négatives pour ces deux marqueurs et aucune modulation de

l'expression n'a été observée après traitement avec les inhibiteurs de COX-2. Ces données suggèrent donc une différenciation des cellules Hel en mégacaryocytes.

La différentiation érythroïde de ces deux lignées a été vérifiée par le test à la benzidine. En effet, ce test permet de révéler les cellules exprimant des hémoglobines (voir matériel et méthodes). Les cellules positives pour le test apparaissent en bleu. En tant que témoin positif, nous avons utilisé l'hémine (Woessmann and Mivechi 2001). Pour les cellules Hel, aucune positivité n'a été observée, même pour 6 jours de traitement par nimésulide ou le célécoxib. Pour la lignée K562, seul le nimésulide et seulement après 72h de traitement conduit à une légère augmentation du nombre de cellules positive à la benzidine (21,33 ± 1,15% contre 7 ± 3,46% dans les cellules non-traitées). Cet effet n'est pas conservé après 6 jours de traitement.

Nos résultats suggèrent donc que les inhibiteurs de COX-2 conduisent au passage des deux lignées de leucémie myéloïde aiguë (U937 et Hel), qui sont sensibles aux inhibiteurs de COX-2, à un état plus différencié pro-myéloïde avec une tendance vers la voie granulocytaire pour les cellules U937 et mégacaryocytaires pour les cellules Hel. L'ensemble des résultats obtenus est récapitulé dans la figure 51.

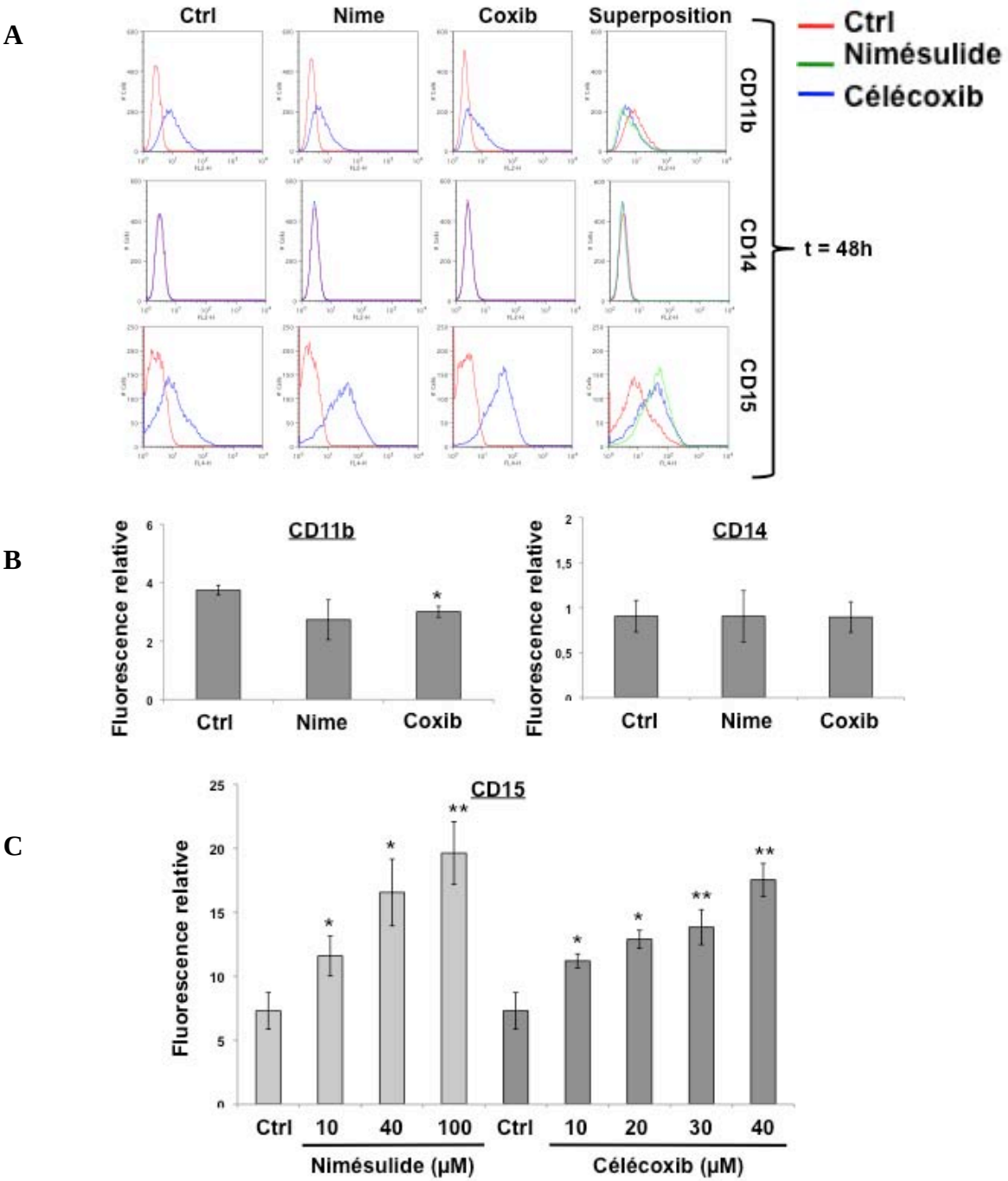


Figure 45 : Etude de l'effet du nimésulide et du célécoxib sur l'expression de CD-11b, CD-14 et de CD-15 dans les cellules U937

Les cellules U937 ont été traitées pendant 48h par du nimésulide (10, 40 et 100µM) ou du célécoxib (10, 20, 30 et 40µM). L'expression des marqueurs de différenciation CD11b, CD14 et CD15 a été étudiée par cytométrie en flux. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard).* : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

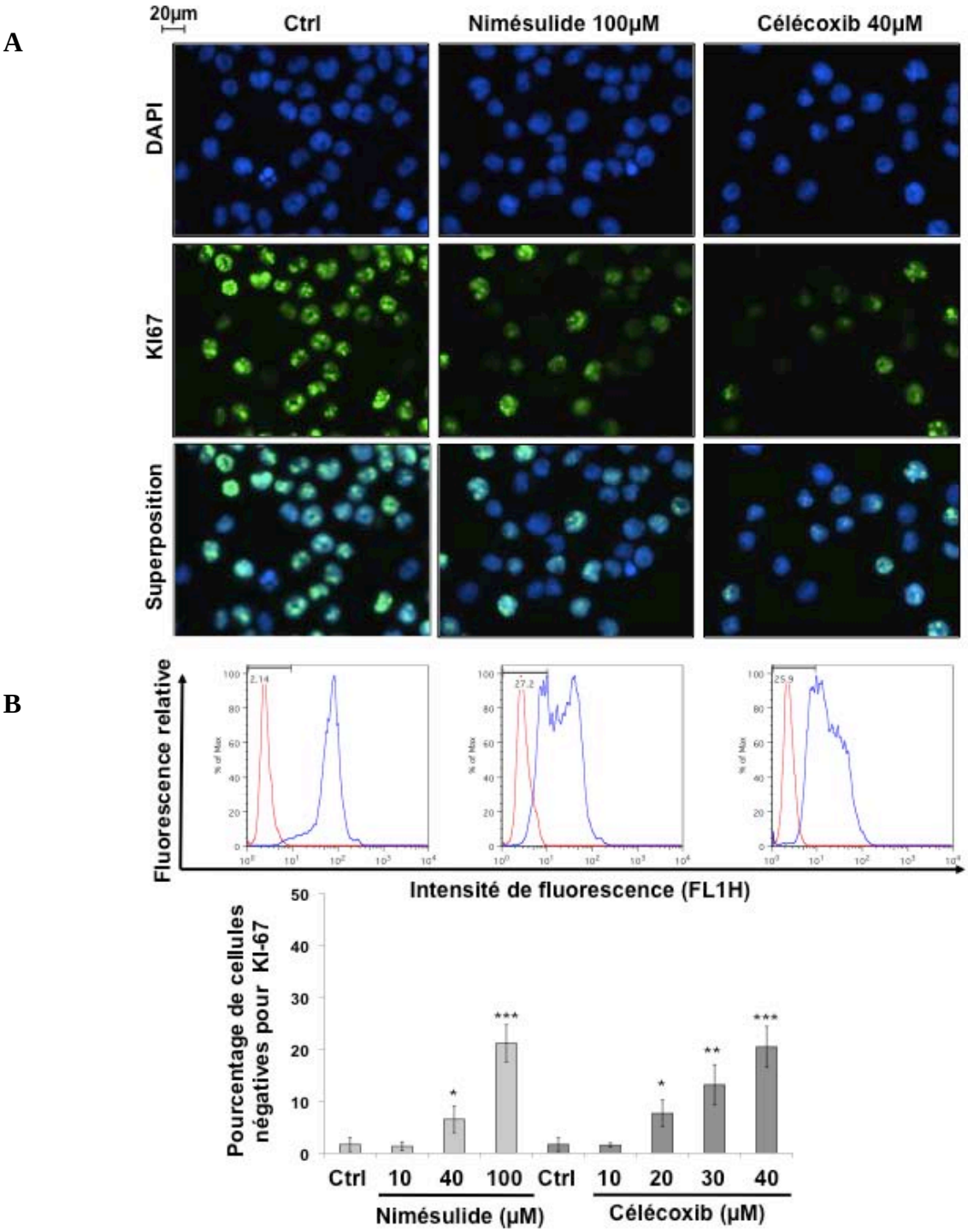


Figure 46 : Etude de l'effet du nimésulide et du célécoxib sur l'expression de Ki-67 dans les cellules U937

Les cellules U937 ont été traitées pendant 48h à différentes concentrations de nimésulide ou de célécoxib. L'expression de Ki-67 a été étudiée par immunofluorescence et microscopie. La quantification a été effectuée par cytométrie en flux. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

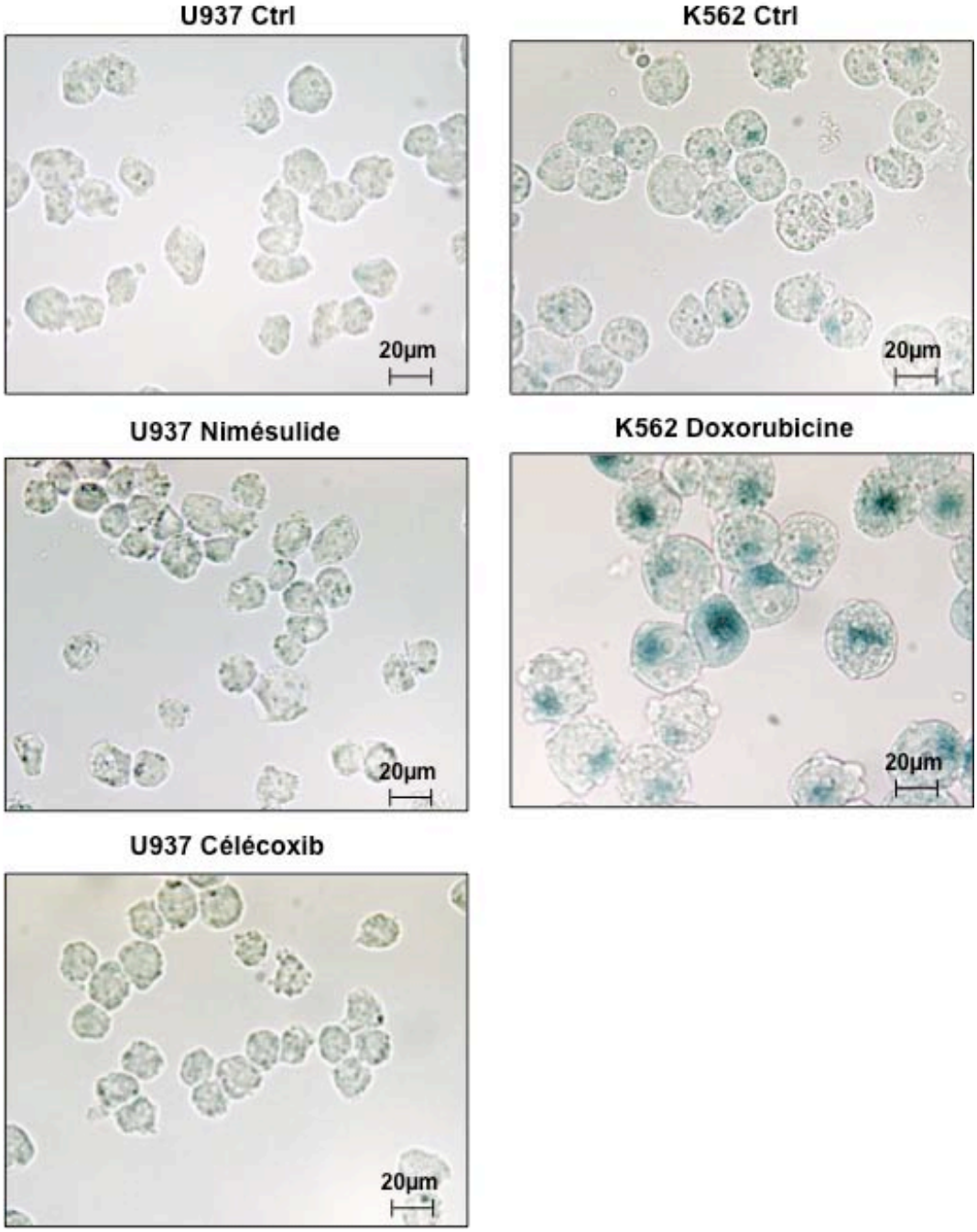


Figure 47 : Activité β-galactosidase des cellules U937 traitées par le nimésulide

Les cellules U937 ont été traitées pendant 48h par 100µM de nimésulide. L'activité de la β-gal a ensuite été révélée à pH-6 par le X-gal. Les cellules ont ensuite été observées au microscope. Les cellules sénescentes apparaissent avec une coloration bleue. Les cellules K562 traitées par la doxorubicine (100nM) pendant 4 jours ont été utilisées comme contrôle positif. Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires.

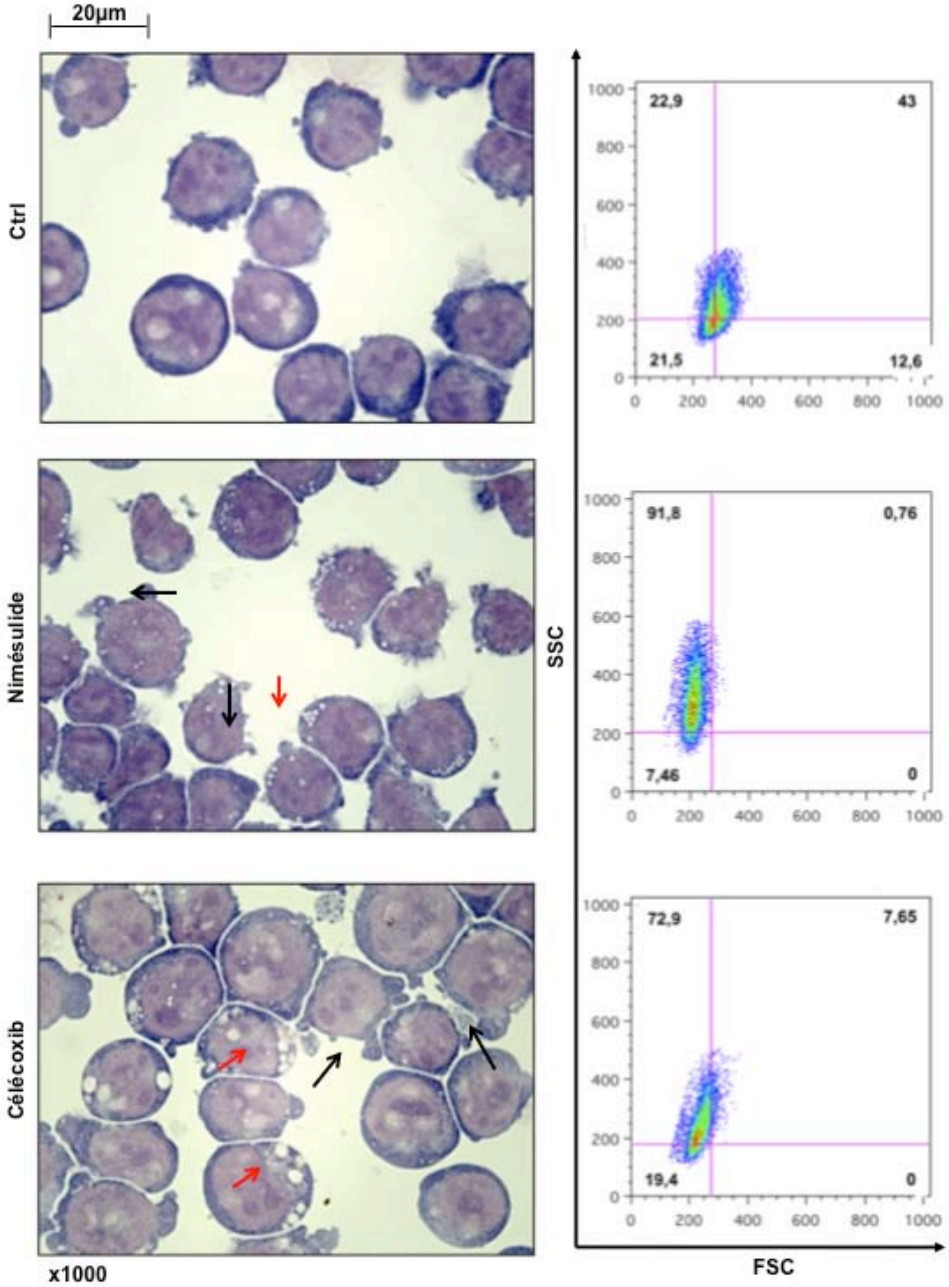


Figure 48 : Observations des cellules U937 traitées pendant 48h avec le nimésulide ou avec le célécoxib

Les cellules ont été ensemencées à une concentration de 200000 cellules/mL puis exposées au nimésulide (100µM) ou au célécoxib (40µM) pendant 48h. Les cellules ont ensuite été colorées par May-Grünwald Giemsa. La taille et la granulosité des cellules U937 a été étudiée par cytométrie en flux (SSC/FSC). Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires. Ctrl : Contrôle. Les flèches rouges montrent les vacuoles cytoplasmiques. Les flèches noires montrent les expansions cytoplasmiques.

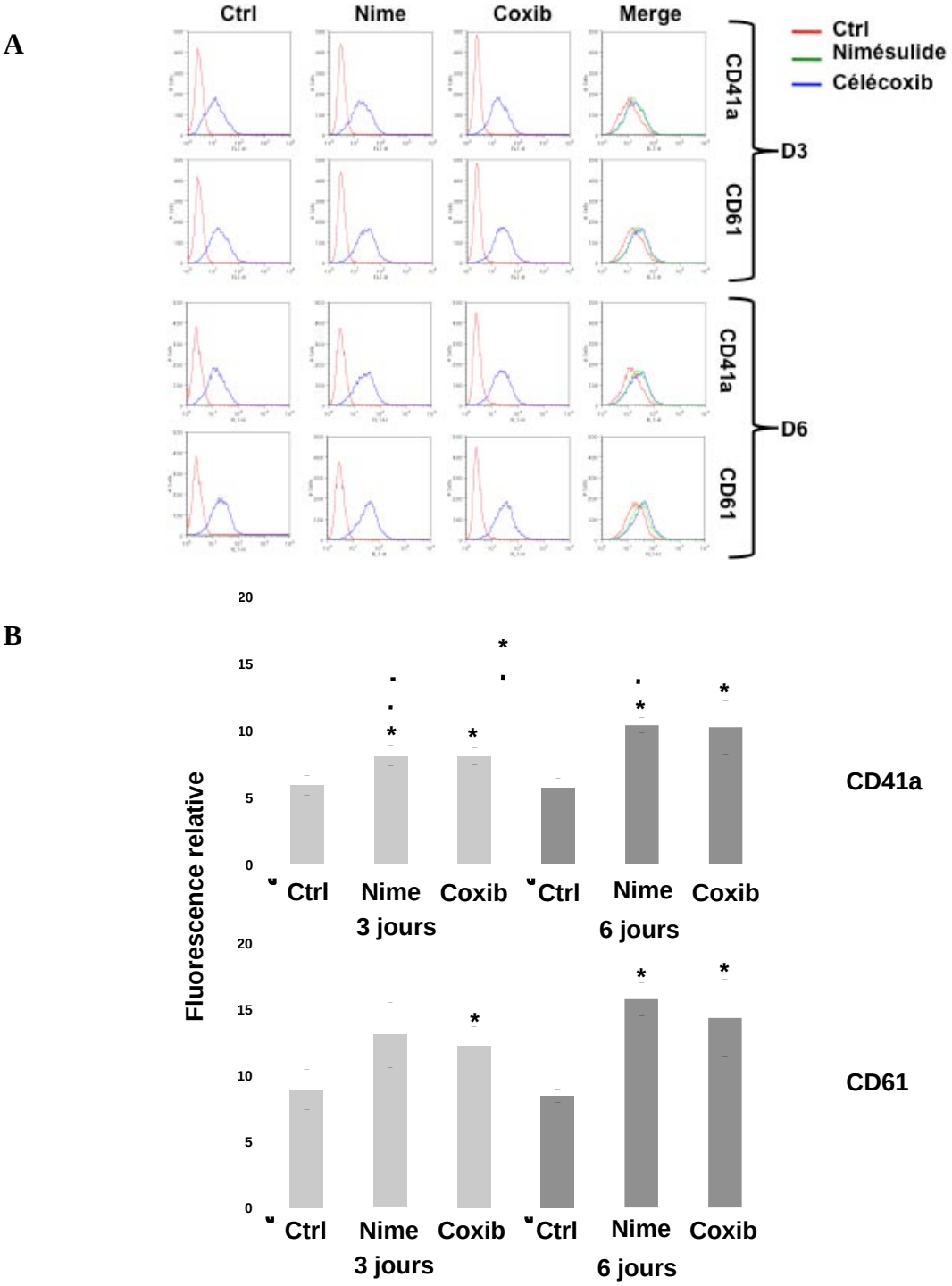


Figure 49 : Etude de l'effet du nimésulide et du célécoxib sur l'expression de CD41a et de CD61 dans les cellules Hel et K562

Les cellules Hel et K562 ont été traitées pendant 3 jours et 6 jours par du nimésulide (100µM) ou du célécoxib (40µM). L'expression des marqueurs de différenciation mégacaryocytaire, CD41a et CD61 a été étudiée par cytométrie en flux. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard).* : $p < 0,05$

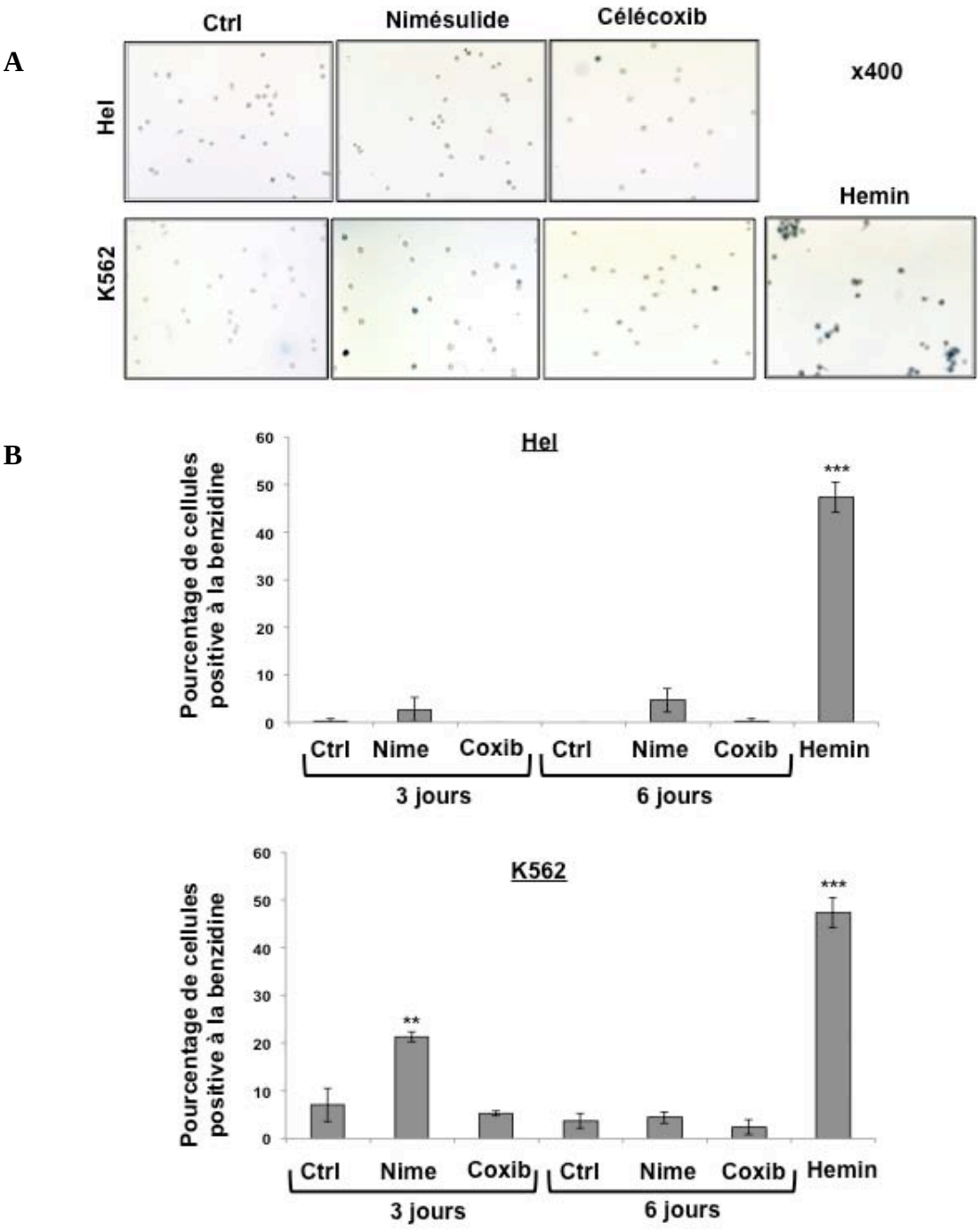


Figure 50 : Etude de l'effet du nimésulide et du célécoxib sur la différenciation érythroïde des cellules Hel et K562

Les cellules Hel et K562 ont été traitées pendant 3 jours et 6 jours par du nimésulide (100µM) ou du célécoxib (40µM). La différenciation érythroïde a été étudiée à l'aide du test à la benzidine. Un traitement des cellules K562 par 25µM d'hémine pendant 3 jours a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

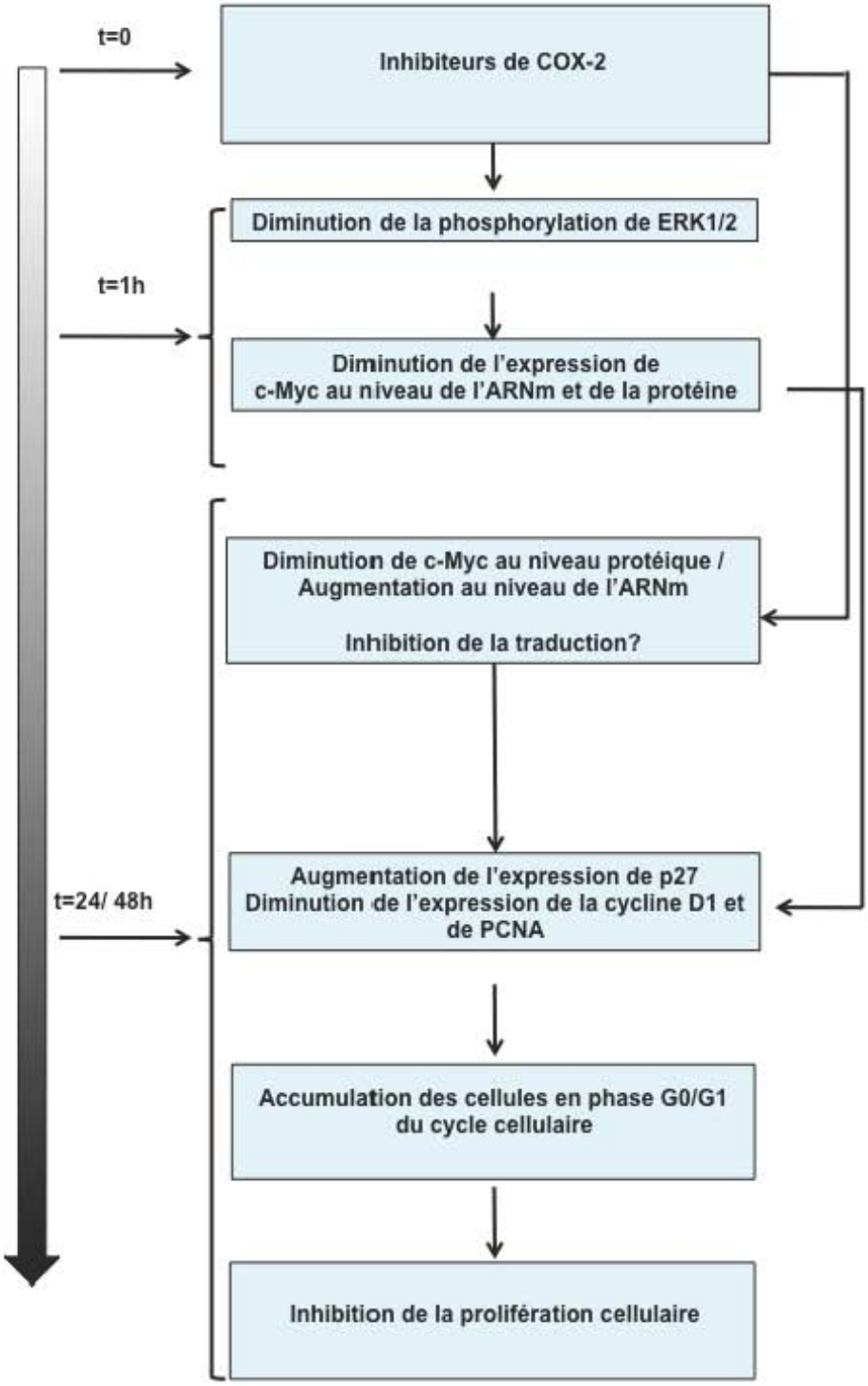


Figure 51 : Récapitulatis des résultats obtenus sur l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération et le cycle cellulaire des cellules U937

4.4 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose intrinsèque de lignées cellulaires hématologiques

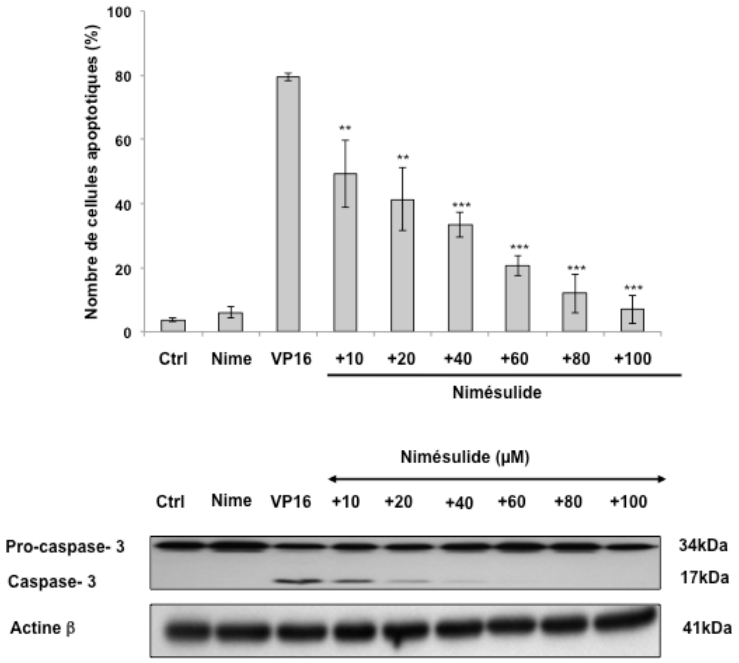
De nombreuses études ont révélé que les inhibiteurs de COX-2 pouvaient influencer la sensibilité de plusieurs types de cellules cancéreuses à l'apoptose induite par différents agents chimiothérapeutiques (Zhang, Liu et al. 2006). Nous avons voulu savoir si ces inhibiteurs pouvaient sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques.

4.4.1 Effet du nimésulide et du NS-398 sur l'apoptose induite par l'étoposide

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet du nimésulide sur l'apoptose des cellules U937 induite par l'étoposide, un inhibiteur de topoisomérase II. Les cellules U937 ont été traitées par le nimésulide à différentes concentrations (de 10 à 100µM) pendant 24h. Puis nous avons ajouté de l'étoposide à la concentration finale de 100µM pendant 5h. Les cellules apoptotiques ont ensuite été comptées par morphologie nucléaire, comme précédemment à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342. Nous avons ainsi remarqué que l'inhibiteur seul n'induit pas l'apoptose des cellules U937. Les cellules traitées par l'étoposide présentent un pourcentage d'apoptose de 79,33 ± 1,15%. Pour les cellules prétraitées par le nimésulide, une diminution de l'apoptose induite par l'étoposide a été observée. La différence est significative dès 10µM de nimésulide et devient maximale à 100µM avec un pourcentage d'apoptose égal aux cellules non traitées (7 ± 4,36%). Nous avons confirmé ces résultats en étudiant le clivage de la caspase-3, dans la lignée U937 par Western Blot (figure 43).

Nous avons réalisé les mêmes tests avec le NS-398, c'est-à-dire un prétraitement de 24h des cellules U937 par différentes concentrations de NS-398 (10-100µM) suivi d'une exposition à l'étoposide (100µM pendant 5h) (Figure 52). L'apoptose a ensuite été étudiée par analyse de la morphologie nucléaire. Pour la lignée U937, nous constatons le même effet qu'avec le nimésulide, c'est-à-dire une protection des cellules à l'apoptose induite par l'étoposide. La protection commence dès 10µM et s'accentue avec les concentrations plus fortes. Pour les cellules prétraitées par 100µM de NS-398, une protection à l'apoptose induite par l'étoposide peut être observée.

A



B

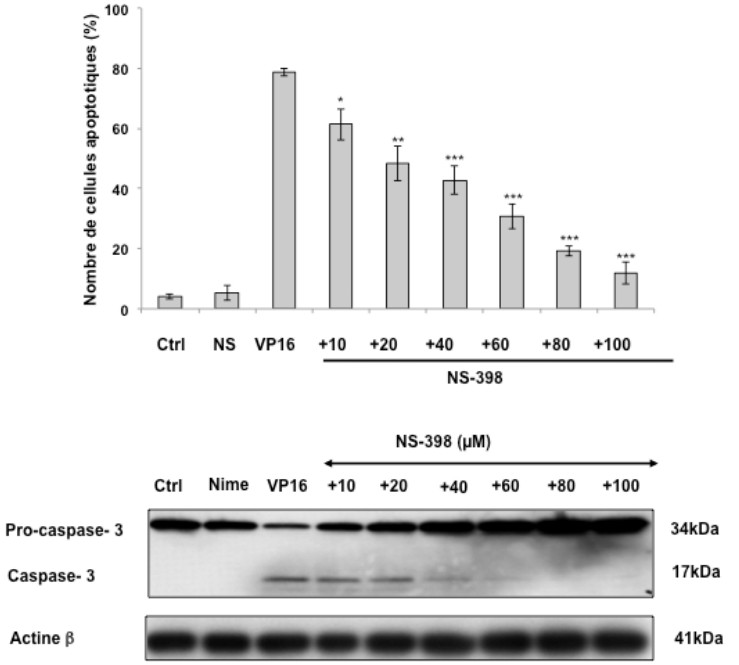


Figure 52 : Etude de l'effet du nimésulide sur l'apoptose induite par l'étoposide

Les cellules U937 (**A**) et K562 (**B**) ont été prétraitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10-100µM), puis exposées pendant 5h à l'étoposide (100µM). L'apoptose a été analysée par analyse de la morphologie nucléaire. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : contrôle ; Nime : nimésulide ; VP16 : étoposide. * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

La protection est significative dès 10µM avec une diminution de 21,99 ± 6,95% de l'apoptose par rapport à l'étoposide seul. Pour la concentration maximale, la protection est totale, puisque le pourcentage d'apoptose est de 12 ± 3,74% comme pour les cellules non traitées. L'effet observé est donc similaire à celui obtenu avec le nimésulide.

Comme précédemment, nous avons étudié le clivage de la caspase-3, dans la lignée U937 par Western Blot (Figure 52).

4.4.2 Effet du nimésulide et du NS-398 sur l'apoptose induite par d'autres agents inducteurs de l'apoptose intrinsèque

Afin de savoir si l'effet chimioprotecteur observé est spécifique de l'étoposide, nous avons étudié l'effet du nimésulide sur l'apoptose induite par la camptothécine et l'irinotécan, deux inhibiteurs de topoisomérase I ; la doxorubicine, un agent intercalant ; le cisplatine et le méthotrexate, deux agents alkylants et la cytarabine, un analogue de cytosine (cytosar®). Les cellules U937 ont été exposées pendant 24h à différentes concentrations de nimésulide (10-100µM). Puis les cellules U937 ont été exposées pendant 24h à la camptothécine (10µM), 24h à l'irinotécan (10µM), 8h à la doxorubicine (4µM), 8h au cisplatine (100µM), 24h au méthotrexate (2mM) et 24h à la cytarabine (10µM). L'apoptose a été évaluée par étude de la morphologie nucléaire comme précédemment. Nous avons ainsi observé une protection des cellules U937 prétraitées par l'inhibiteur spécifique de COX-2 vis-à-vis des différents agents chimiothérapeutiques.

L'effet chimioprotecteur observé avec le nimésulide n'est donc pas seulement spécifique de l'étoposide, mais peut être généralisé à d'autres agents chimiothérapeutiques.

Les inhibiteurs de COX-2 induisent une protection à l'apoptose induite par différents agents chimiothérapeutiques.

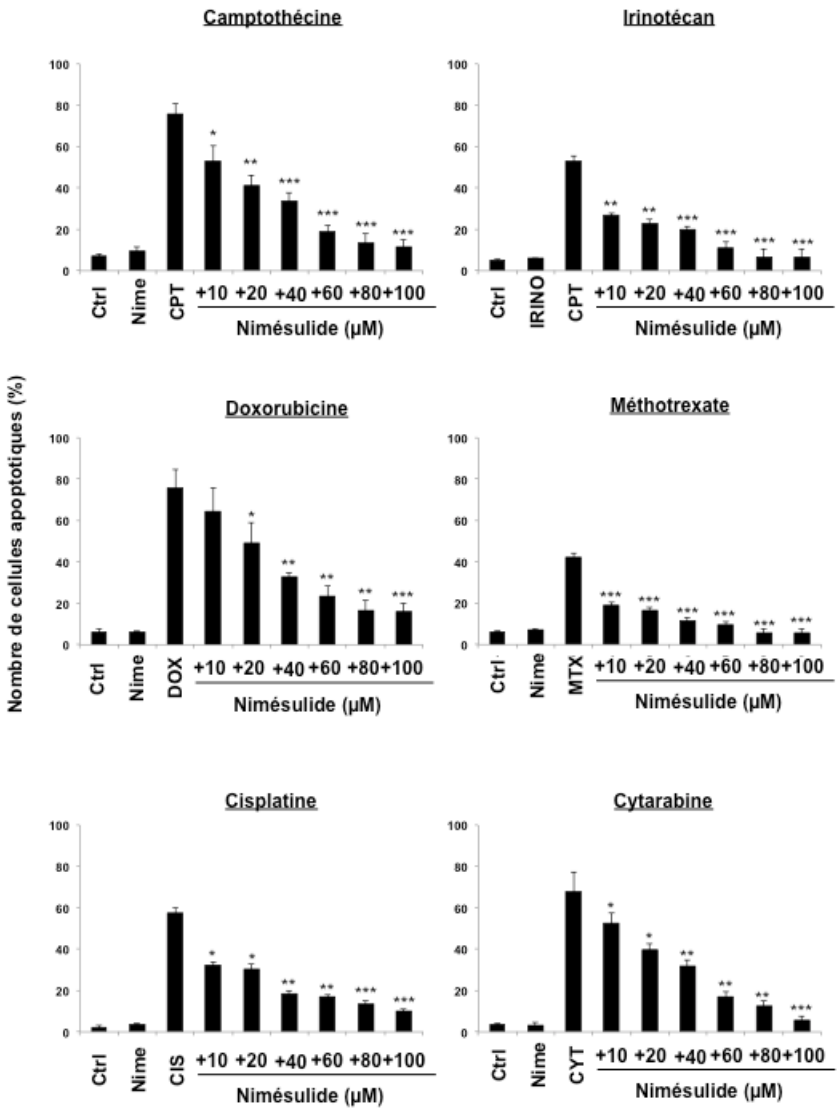


Figure 53: Etude de l'effet du nimésulide sur l'apoptose induite par plusieurs agents chimiothérapeutiques

Les cellules U937 ont été prétraitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10-100µM), puis exposées à la camptothécine (10µM, 8h), à la doxorubicine (4µM, 8h), au cisplatine (100µM, 24h), à l'irinotécan (10µM, 8h), au méthotrexate (20µM, 8h) ou à la cytarabine (10µM, 24h). L'apoptose a été analysée par morphologie nucléaire. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : contrôle ; Nime : nimésulide; DOXO : doxorubicine CPT : camptothécine ; IRI : irinotécan ; CIS : cisplatine ; CYT : cytarabine ; MTX : Méthotrexate. * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

4.4.3 Effet du nimésulide et du NS-398 sur l'apoptose extrinsèque

Afin de comprendre si l'effet anti-apoptotique de ces deux inhibiteurs de COX-2 est spécifique de l'apoptose intrinsèque (induite par un stress), nous avons induit l'apoptose des cellules U937 d'une manière physiologique en utilisant FasL (Fas ligand), le TNFα et TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing-ligand) des inducteurs de l'apoptose extrinsèque (Fulda *et al.* 2006; Testa 2010). Les cellules U937 et K562 ont été traitées pendant 24h par différentes concentrations d'inhibiteurs de COX-2 (nimésulide ou NS-398 de 10 à 100µM), puis traitées pendant 16h par FasL (50ng/mL) ou 8h par 20ng/mL de TNFα ou par 5ng/mL de TRAIL. L'apoptose a ensuite été évaluée par observation de la morphologie nucléaire à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342 (Figure 54, Figure 55). Nous avons ainsi remarqué que le pourcentage de cellules apoptotiques atteint 45,33 ± 1,89% pour le TNFα, 75,75 ± 6,42% pour FasL et 45,33 ± 0,47% pour TRAIL. Ce pourcentage n'est pas significativement modifié avec le prétraitement par les inhibiteurs de COX-2 pour la lignée U937. Ces résultats nous indiquent donc que seule l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques est affectée par le traitement avec les inhibiteurs de COX-2

Nos résultats ont montré que les inhibiteurs de COX-2 inhibent seulement l'apoptose intrinsèque induite par les agents chimiothérapeutiques et non l'apoptose extrinsèque induite par le TNFα, FasL ou TRAIL.

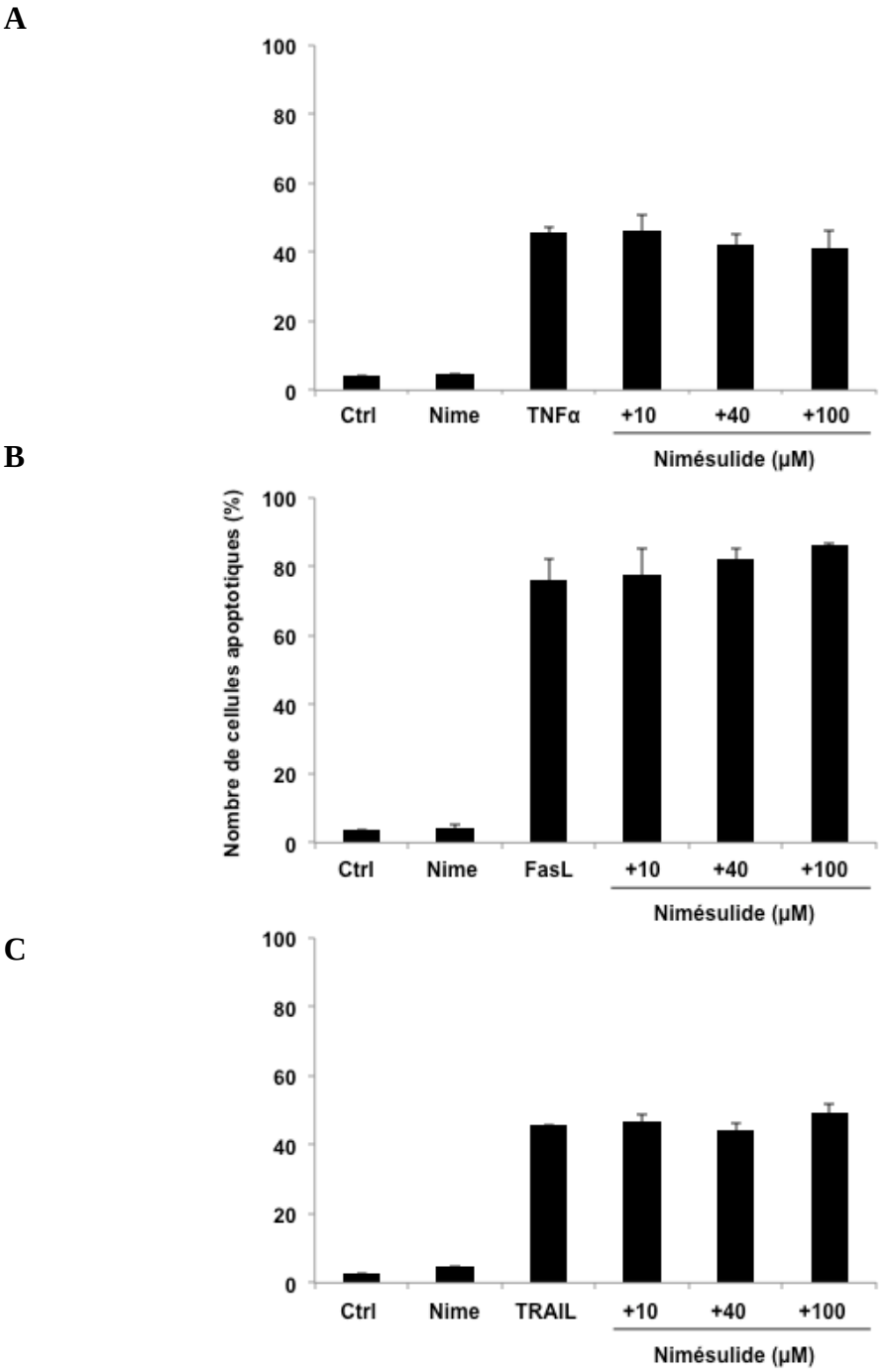


Figure 54: Effet du nimésulide sur l'apoptose induite par le TNFα, FasL et TRAIL

Les cellules U937 et K562 ont été exposées pendant 24h au nimésulide (10-100µM) puis traitées pendant 16h par FasL (**A**) (50ng/mL) ou 20ng/mL de TNFα (**B**) ou TRAIL (5ng/mL) (**C**). L'apoptose a été évaluée par morphologie nucléaire. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard).

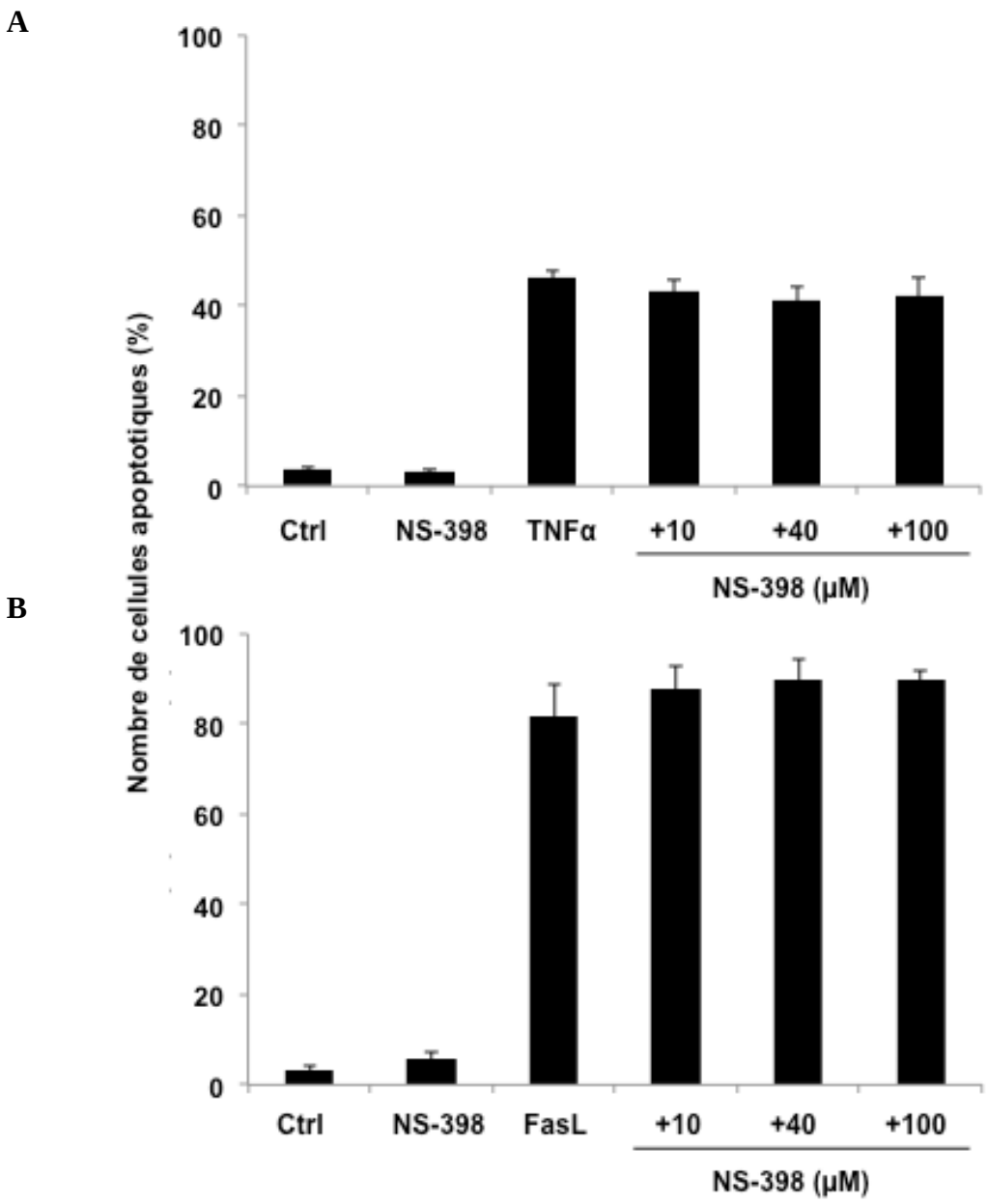


Figure 55: Effet du NS-398 sur l'apoptose induite par le TNFα et FasL

Les cellules U937 ont été exposées pendant 24h au NS-398 (10-100µM) puis exposées pendant 24h à 20ng/mL de TNFα (**A**) ou 16h à FasL (**B**) (50ng/mL). L'apoptose a été évaluée par morphologie nucléaire. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard).

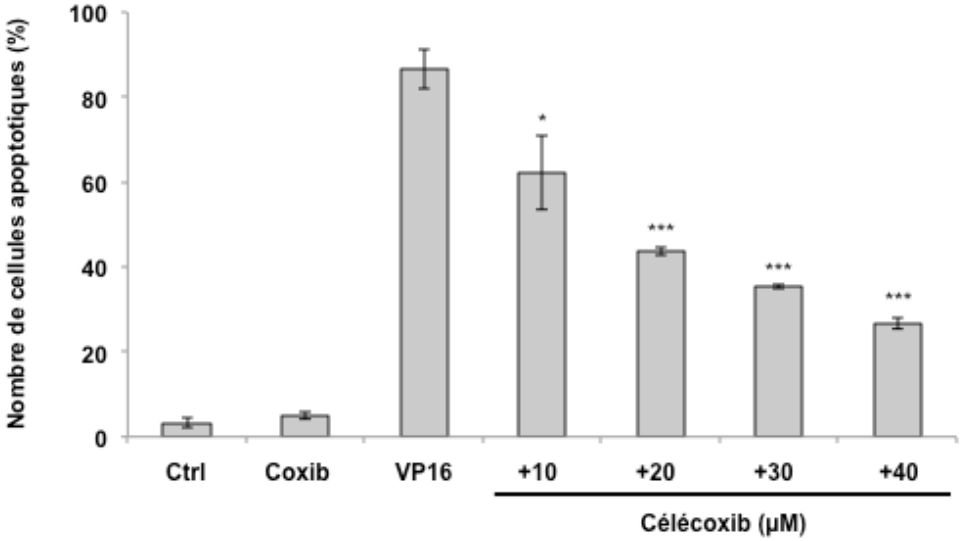
4.4.4 Étude de la dépendance avec l'activité de COX-2

Comme nos résultats précédents avaient suggéré un effet indépendant de l'inhibition de COX-2 (voir section 4.3.9), nous avons étendu notre analyse au célécoxib, qui possède une structure chimique différente de celle du nimésulide ou du NS-398. Nous avons donc évalué l'effet du célécoxib sur l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules U937 (Figure 56 A). L'étude de l'apoptose par morphologie nucléaire nous a permis de montrer que tout comme le nimésulide et le NS-398, le célécoxib induit une protection à l'apoptose induite par l'étoposide. La protection est observable dès 10µM. Pour 40µM, la protection est la plus importante (26,67 ± 1,25% d'apoptose contre 86,67 ± 4,78 % avec l'étoposide seul) mais n'atteint pas celle observée avec 100µM de nimésulide ou de NS-398.

Nous avons ensuite utilisé un analogue du célécoxib, le 2,5-diméthyl-célécoxib (DMC) (Kardosh, Wang et al. 2005). Ce dérivé est très semblable au célécoxib, du point de vue de sa structure chimique et de sa composition mais ne possède pas la capacité d'inhiber l'activité de COX-2 (Kardosh, Wang et al. 2005). Nous avons donc traité les cellules U937 à différentes concentrations de DMC, puis nous avons traité les cellules par l'étoposide (100µM pendant 5h) (Figure 56 B). Pour cette expérience, nous avons utilisé des concentrations de DMC plus faibles que le célécoxib à cause de son pouvoir inducteur d'apoptose dès 20µM. Pour les cellules U937, nous avons observé que le prétraitement avec le DMC conduit à une protection des cellules à l'apoptose induite par l'étoposide. L'effet est significatif dès 10µM de traitement. Nos résultats supportent donc l'hypothèse d'un effet indépendant de l'inhibition de COX-2 que nous avons émis précédemment (voir section 4.3.9).

Ces résultats montrent des similitudes entre l'effet induit par le célécoxib comparé à celui induit par le DMC. Ces données suggèrent que le célécoxib induit une protection à l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques, d'une manière indépendante de COX-2.

A



B

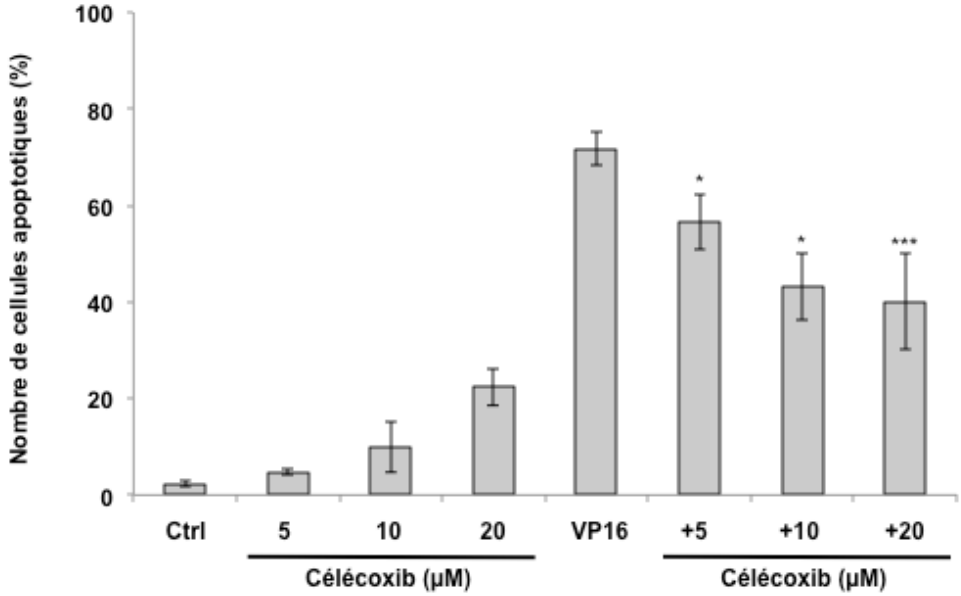


Figure 56 : Etude de l'effet du célécoxib et du DMC sur l'apoptose induite par l'étoposide

Les cellules U937 ont été prétraitées pendant 24h par différentes concentrations de célécoxib (**A**) (10, 20, 30, 40µM) ou de DMC (5, 10, 20µM) (**B**), puis exposées pendant 5h à l'étoposide (100µM). L'apoptose a été analysée par morphologie nucléaire. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : contrôle ; VP16 : étoposide ; * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

4.4.5 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose induite par le cisplatine dans les autres lignées cellulaires

Nous avons aussi voulu étudier si l'effet chimioprotecteur des inhibiteurs de COX-2 reste limité à la lignée U937. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons prétraité les autres lignées cellulaires (Hel, Jurkat, Raji et K562) par différentes concentrations de nimésulide ou de célécoxib durant 24h. Puis nous avons traité ces cellules par du cisplatine pendant 8h (100µM). Pour cette expérience, nous avons choisi le cisplatine pour sa capacité à induire l'apoptose dans toutes les lignées cellulaire de manière efficace. L'apoptose a ensuite été évaluée par morphologie nucléaire. Nos résultats montrent que pour le prétraitement par le nimésulide conduit à une diminution de l'apoptose induite par le cisplatine dans les lignées Hel, Jurkat, et Raji. Cet effet n'a pas été observé dans les cellules K562. Des effets similaires ont été obtenus pour le nimésulide et le NS-398 pour l'apoptose induite par l'étoposide dans la lignée K562 (Figure 58). Par contre, le prétraitement avec le célécoxib conduit une diminution de l'apoptose induite par le cisplatine dans toutes les lignées cellulaires. Ces effets différents des deux inhibiteurs de COX-2 dans la lignée K562 renforcent l'hypothèse d'un effet indépendant de COX-2, comme nous l'avons suggéré précédemment.

Nos résultats montrent que l'effet chimioprotecteur peut être observé dans d'autres lignées cellulaires hématopoïétiques. Nos résultats précédents ayant démontré que le niveau d'expression de COX-2 est très faible dans les cellules K562, nous pouvons émettre l'hypothèse d'un effet indépendant de l'inhibition de COX-2.

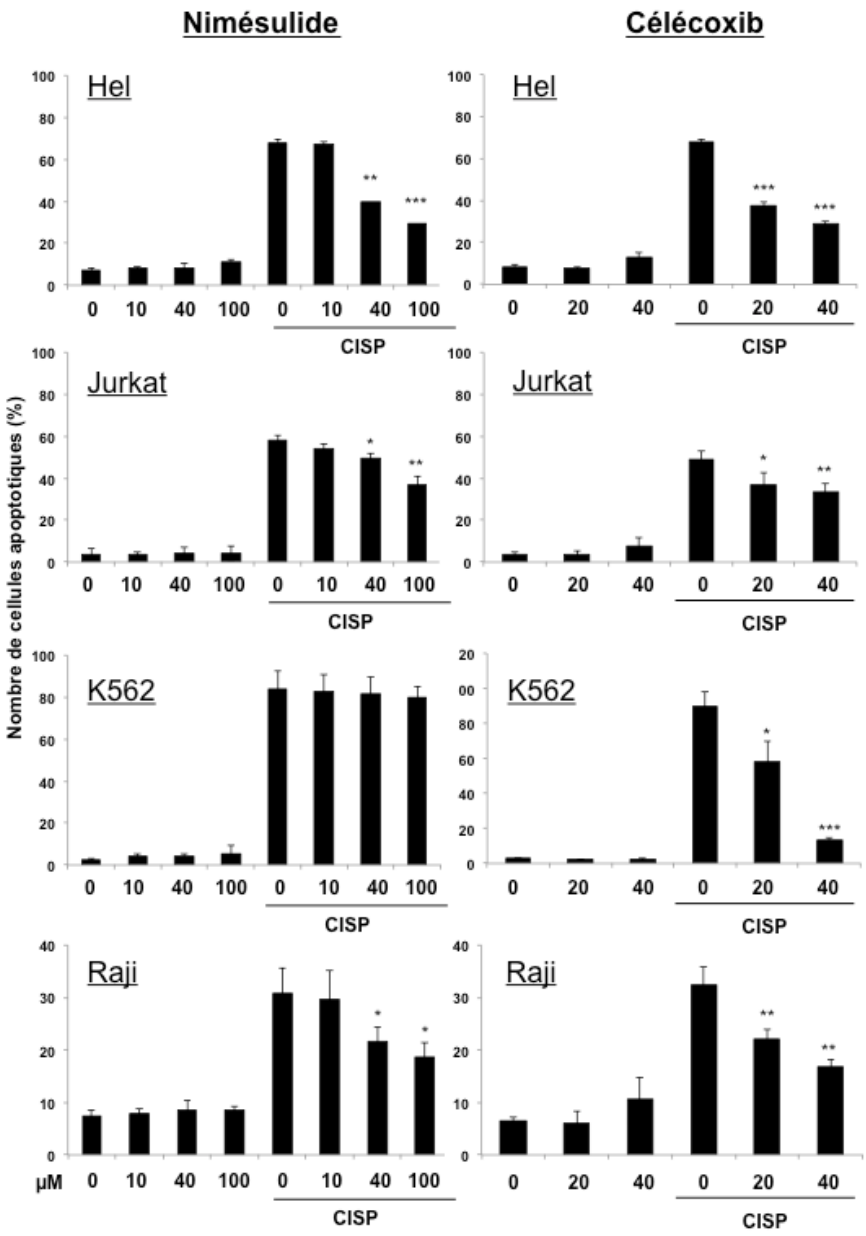
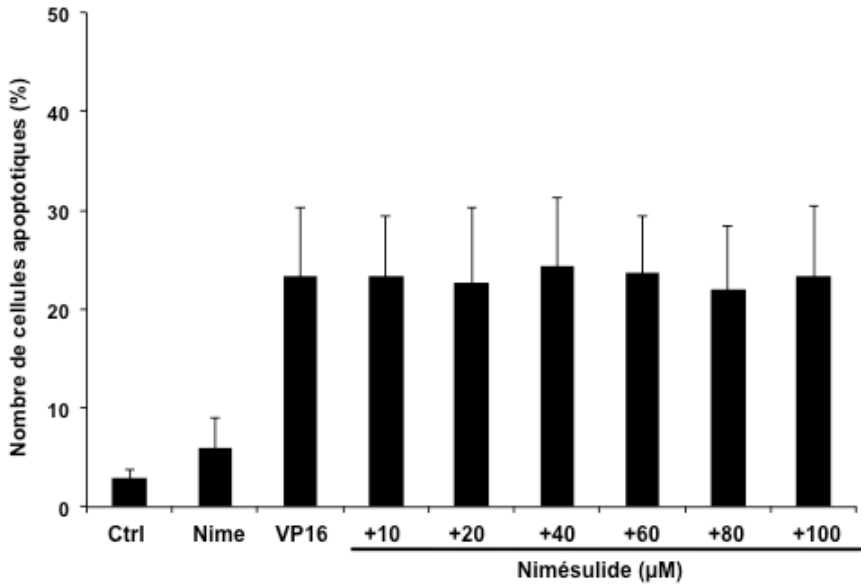


Figure 57 : Etude de l'effet du nimésulide et du célécoxib sur l'apoptose induite par le cisplatine dans les autres lignées hématopoïétiques.

Les cellules Hel, Jurkat, K562, Raji ont été prétraitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10-100µM) ou de célécoxib (10-40µM), puis exposées pendant 5h au cisplatine (100µM). L'apoptose a été analysée par morphologie nucléaire. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). CIS : cisplatine ; * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

A



B

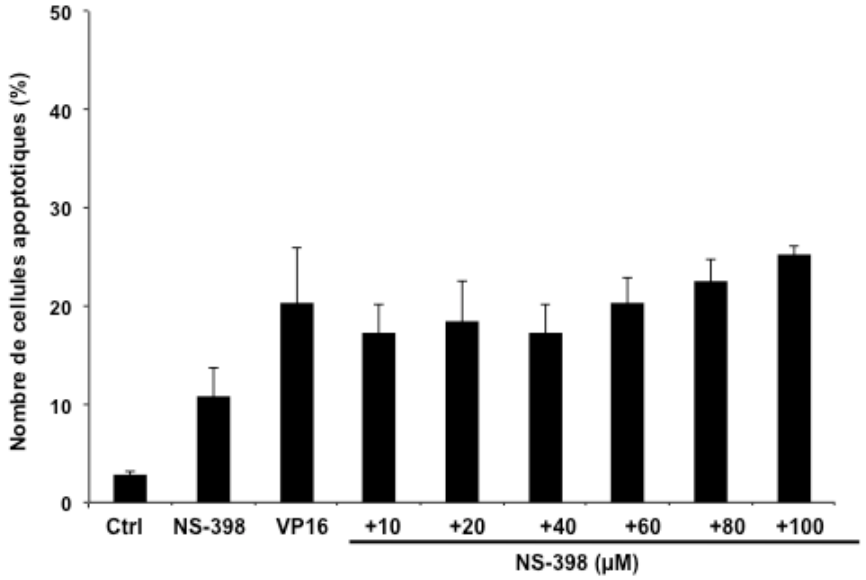


Figure 58 : Etude de l'effet du nimésulide et du NS-398 sur l'apoptose induite par l'étoposide dans les cellules K562

Les cellules K562 ont été prétraitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (**A**) ou de NS-398 (**B**) (10, 40 et 100µM), puis exposées pendant 5h à de l'étoposide (100µM). L'apoptose a été analysée par analyse de la morphologie nucléaire. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : contrôle ; Nime : nimésulide ; VP16 : étoposide. * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$

4.4.6 Effet du nimésulide et du NS-398 sur la voie intrinsèque mitochondriale

Précédemment, nous avons montré que les inhibiteurs de COX-2 préviennent l'activation de la caspase-3 induite par l'étoposide. Le clivage de la caspase-3 dépend de l'activité d'autres caspases et notamment de la caspase-8 et de la caspase-9 (Coppola and Ghibelli 2000). Afin de mieux comprendre le mécanisme impliqué dans l'inhibition de l'activation de la caspase-3, nous avons étudié l'effet du nimésulide et du NS-398 sur le clivage de ces caspases (Figure 59, Figure 60). Nous avons constaté la présence des formes clivées pour les cellules traitées par l'étoposide, associée à une diminution de l'expression des pro-caspases-8 et -9. Pour les cellules qui ont été prétraitées par du nimésulide ou du NS-398 avant l'exposition avec l'étoposide, nous constatons que le clivage des pro-caspases-8 et -9 est diminué dès 10µM par rapport à l'étoposide seul. Plus la concentration est importante, plus l'effet est important.

L'activité des caspases peut être inhibé par plusieurs protéines de la famille IAP telle que la survivine ou encore XIAP (Tamm, Wang et al. 1998). Il est donc possible que ces protéines soient impliquées dans l'effet chimioprotecteur observé et c'est pourquoi nous avons analysé l'expression de XIAP dans les cellules U937 traitées par du nimésulide ou du NS-398 par Western blot (Figure 59, Figure 60). Nous avons ainsi observé que l'expression de XIAP dans les cellules traitées par le nimésulide seul n'est pas modifiée. Par ailleurs, l'expérience où les cellules U937 sont prétraitées par différentes concentrations de nimésulide (10-100µM) pendant 24h puis traitées par l'étoposide pendant 5h (100µM) n'a pas révélée de modification de l'expression de XIAP. Le traitement par l'étoposide n'affecte pas non plus l'expression de cette protéine. La protéine XIAP n'est donc pas impliquée dans l'effet protecteur induit par le nimésulide. Des résultats similaires ont été obtenus avec le NS-398 (Figure 60).

Nous avons ensuite étudié les altérations mitochondriales qui interviennent durant l'apoptose pour activer ces caspases (Coppola and Ghibelli 2000 ; D'Alessio, Cerella et al. 2004), c'est-à-dire la perte du potentiel membranaire mitochondrial et la libération du cytochrome c par les mitochondries.

Nous avons étudié dans un premier temps l'effet du nimésulide sur le potentiel membranaire mitochondrial. Les cellules U937 ont été traitées par du nimésulide à différentes concentrations (de 10 à 100µM) pendant 24h puis par l'étoposide à la concentration de 100µM pendant 3h. Nous avons étudié le potentiel membranaire mitochondrial à l'aide d'un marquage au MitoTracker Red® dont la fluorescence a été quantifiée par cytométrie en flux (Figure 61 A). Nous avons remarqué que le potentiel membranaire mitochondrial était fortement diminué par le traitement avec l'étoposide seul (- 42,06 ± 14,73%). Le nimésulide seul n'affecte pas ce potentiel membranaire (96,47 ± 1,75%). Cependant si les cellules sont prétraitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10-100µM) avant le traitement par l'étoposide, la diminution du potentiel membranaire mitochondrial observée avec l'étoposide est moins importante. Cet effet est significatif dès 40µM (-23,87 ± 4,49 %) et d'autant plus marqué que la concentration en nimésulide est importante. À 100µM, le potentiel est identique aux cellules non traitées, ce qui montre que le nimésulide inhibe complètement la perte de ce potentiel induite par l'étoposide.

Nous avons ensuite étudié l'effet du nimésulide sur la libération du cytochrome c par immunoflorescence et par cytométrie en flux (Figure 61 B). Nous avons constaté que le traitement par l'étoposide (100µM) seul conduit à une libération de cytochrome c dans 28,87 ± 5,22% des cellules. La libération est inhibée dans les cellules U937 prétraitées pendant 24h avec du nimésulide. L'effet commence dès 10µM et est d'autant plus important que la concentration en nimésulide est importante. Avec 100µM de nimésulide, la libération de cytochrome c n'a été observée que dans 5,05 ± 2,2% des cellules.

La chemoprotection induite par les inhibiteurs de COX-2 se situe au moins au niveau des événements mitochondriaux qui interviennent pendant l'apoptose (perte du potentiel membranaire mitochondrial et libération du cytochrome c par la mitochondrie). Ces événements sont sous la dépendance de l'activation et de la translocation vers la mitochondrie de protéines pro-apoptotiques comme par exemple Bax et Bak.

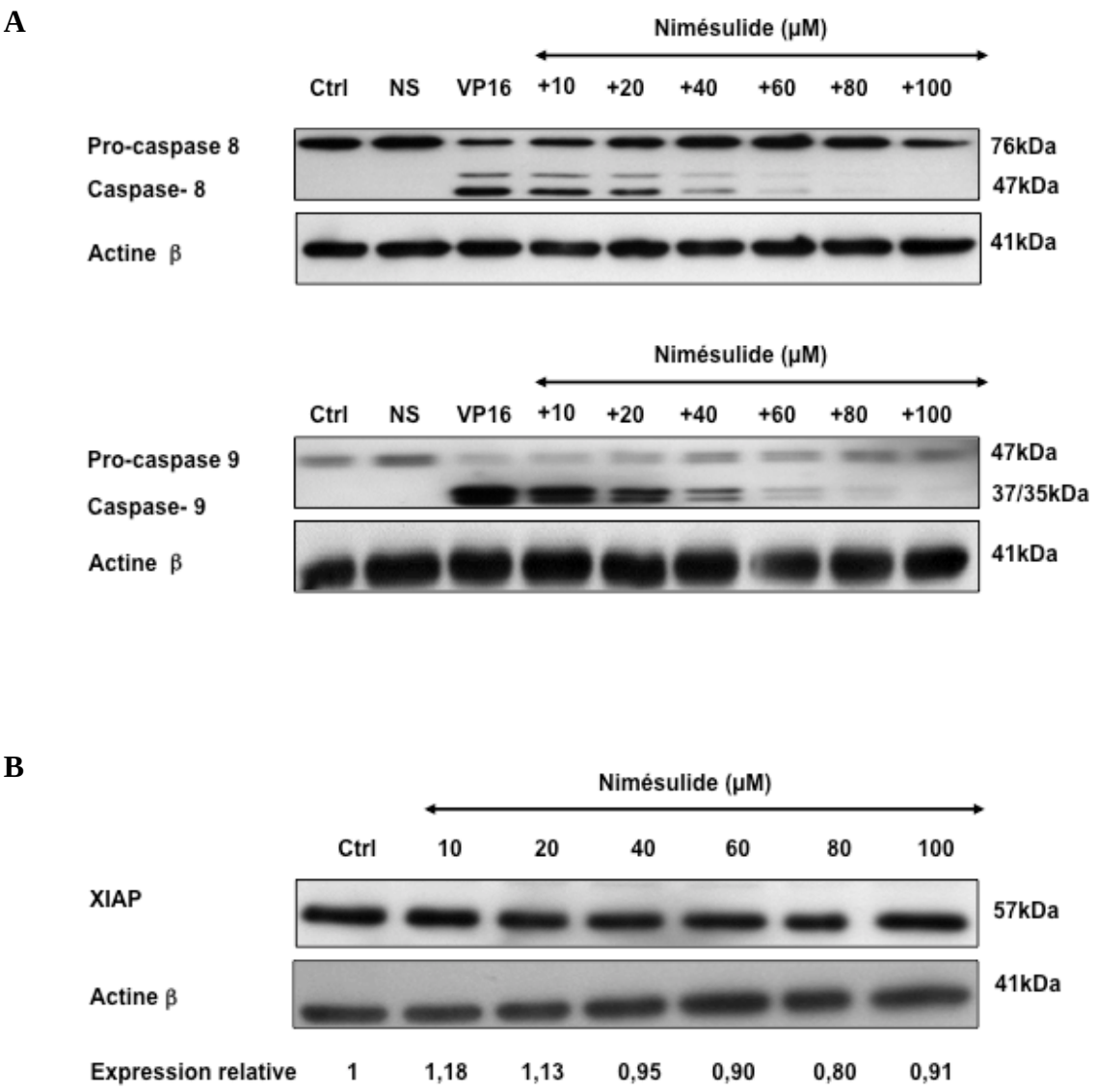


Figure 59: Etude de l'effet du nimésulide sur l'expression de XIAP

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h par du nimésulide (10-100µM) (**A**), ou traitées par du nimésulide, puis exposées ou non à de l'étoposide (100µM pendant 3h (**B**). Le clivage des caspases 3 (**A**), 8 et 9 (**B**) et l'expression de XIAP a été étudié par Western Blot. L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires. Ctrl : contrôle ; Nime : nimésulide ; VP16 : étoposide

.

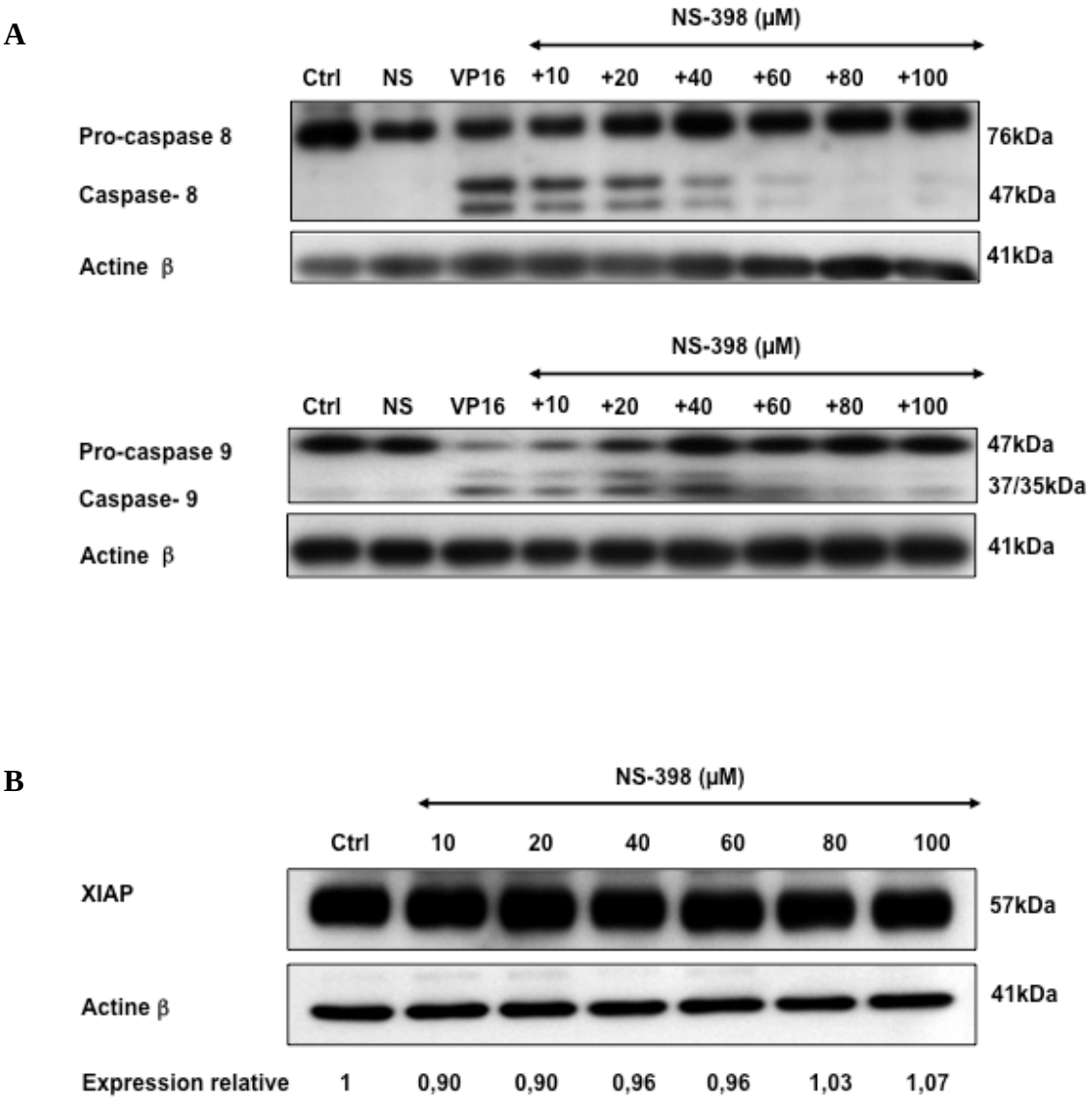
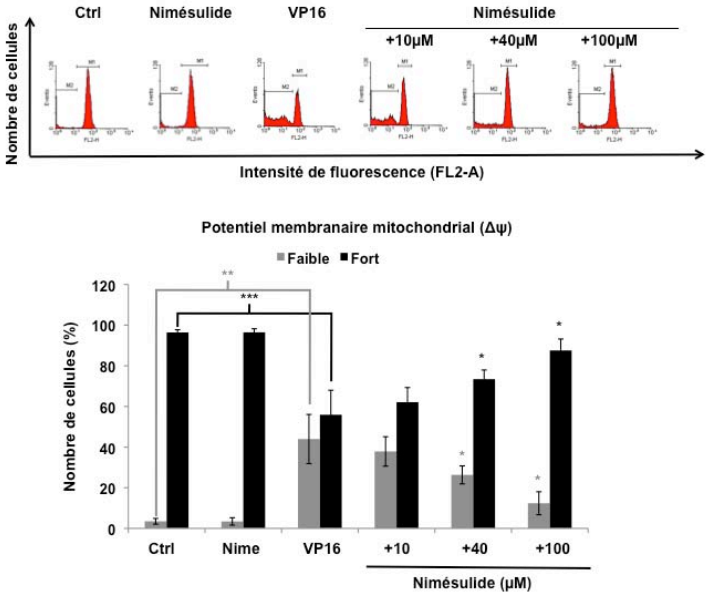


Figure 60 : Etude de l'effet du NS-398 sur l'expression de marqueurs apoptotiques

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h par le NS-398 (10-100µM), puis exposées ou non à l'étoposide (100µM pendant 3h). Le clivage des caspases -8 et -9 (**A**) et l'expression de la protéine XIAP (**B**) ont été étudiés par Western Blot. L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires.

A



B

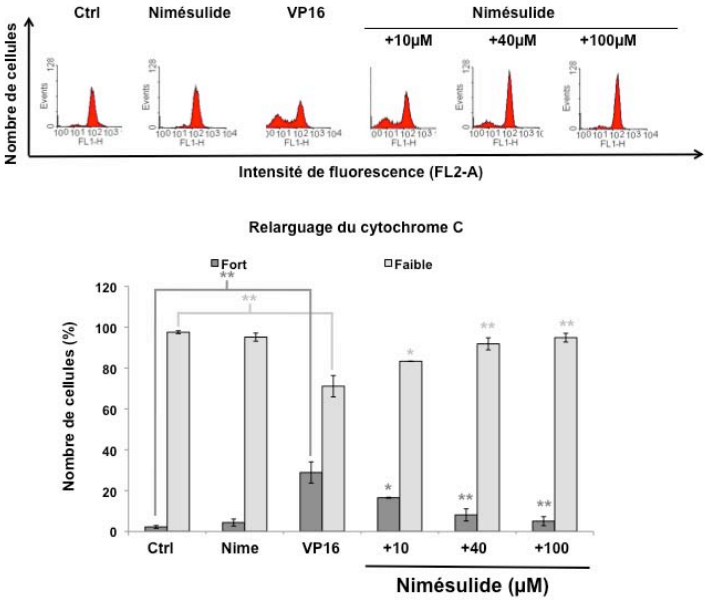


Figure 61: Etude de l'effet du nimésulide sur les événements mitochondriaux intervenant durant l'apoptose.

Les cellules U937 ont été prétraitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10, 40 et 100µM), puis exposées pendant 5h à l'étoposide (VP16) (100µM). Le potentiel membranaire mitochondrial a été évalué par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage au MitoTracker Red. La libération du cytochrome c mitochondrial a été évaluée par cytométrie en flux par immunofluorescence. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : contrôle ; VP16 : étoposide ; * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;*** : $p < 0,001$.

4.4.7 Effet du nimésulide sur l'activation de Bax et de Bak durant l'apoptose

Les inhibiteurs de COX-2 pourraient bloquer l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques en inhibant des événements en amont des altérations mitochondriales. La perte du potentiel membranaire mitochondrial et la libération du cytochrome c par la mitochondrie sont des événements sous le contrôle des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, notamment des protéines Bax et Bak.

Nous avons donc étudié l'effet du nimésulide sur l'activation de la protéine Bax et de la protéine Bak. Nous avons traité les cellules U937 par le nimésulide (100µM) pendant 24h avant de les exposer à 100µM d'étoposide pendant 3h. L'activation de Bax a ensuite été étudiée par immunofluorescence et par cytométrie en flux avec un anticorps spécifique de sa forme active (6A7) (Martin-Latil, Mousson et al. 2007) (Figure 62 A). Le noyau des cellules U937 a été marqué au Hoechst 33342. Nous avons pu observer que les cellules traitées par l'étoposide présentent un marquage positif pour la forme active de Bax (51,0 ± 2%) qui est absent dans les cellules non-traitées (5,7 ± 1,6%). Pour les cellules qui ont été prétraitées par du nimésulide avant l'exposition à l'étoposide, nous avons observé que le pourcentage des cellules avec une activation de Bax est diminué (12,5 ± 2,2%). Le nimésulide prévient donc l'activation de Bax induite par l'étoposide. Durant l'apoptose, la protéine Bax migre vers la mitochondrie (D'Alessio *et al.* 2005). Le traitement par l'étoposide seul conduit à une co-localisation des protéines Bax avec la protéine mitochondriale COX IV, démontrant ainsi une translocation de Bax vers la mitochondrie. Le prétraitement avec le nimésulide prévient cet effet (Figure 62 B). Ces résultats montrent une inhibition de l'activation et de la translocation de Bax vers la mitochondrie.

De même que pour Bax, la forme active de Bak a été analysée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique (Ab-1) (Figure 63). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus avec Bax. L'étoposide induit l'activation de Bak dans 48,3 ± 2,5% des cellules et le prétraitement par le nimésulide prévient l'activation de Bak (10,0 ± 1% des cellules présentant une activation de Bax).

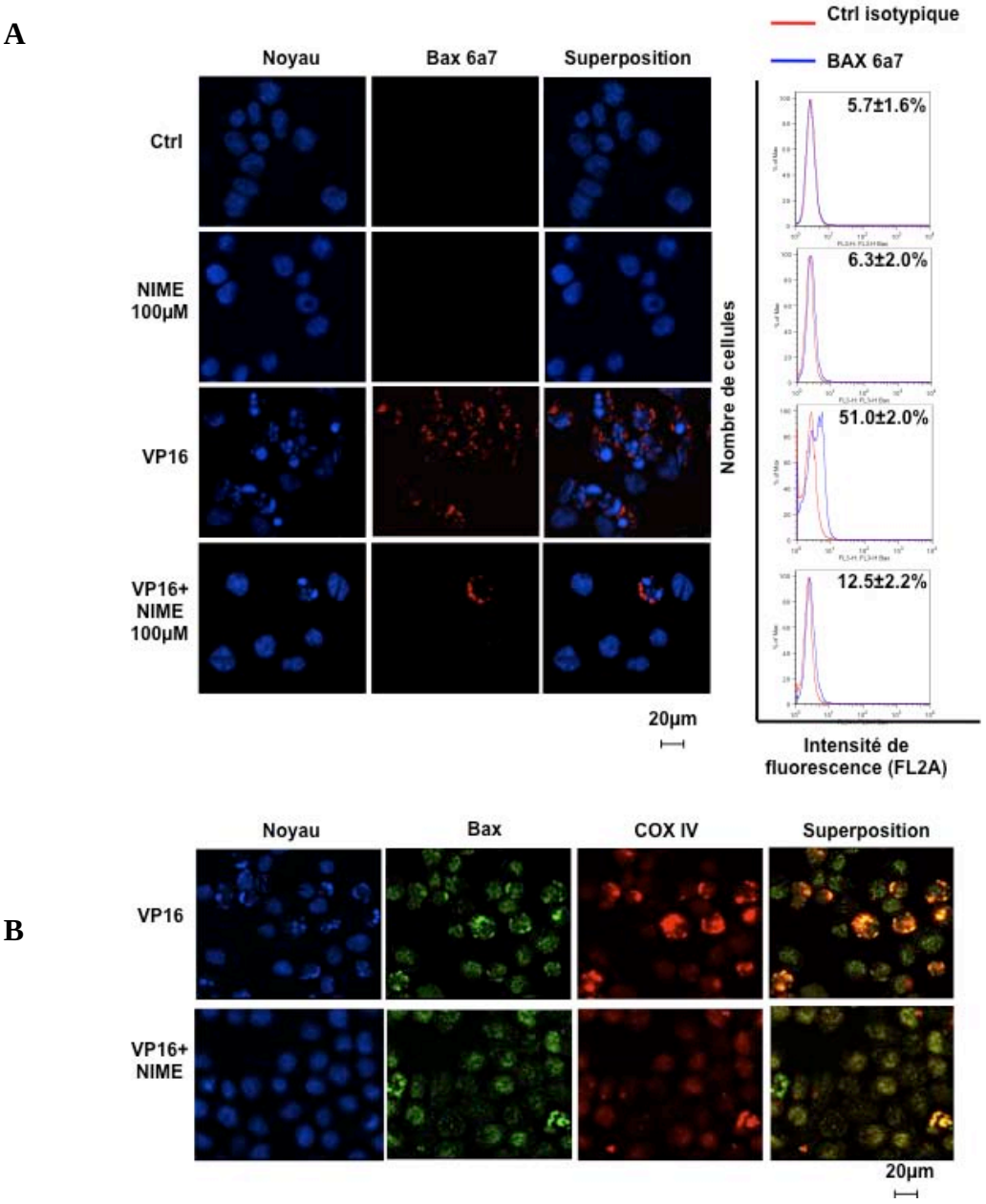


Figure 62 : Etude de l'effet du nimésulide sur l'activation de Bax induite par l'étoposide

Les cellules U937 ont été prétraitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10, 20, 40, 60, 80, 100µM), puis exposées pendant 5h à l'étoposide (100µM). L'activation de Bax a été évaluée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique de la forme active de Bax (6A7). Le noyau des cellules a été marqué au Hoechst 33342. La translocation de Bax a été étudiée par l'étude de la co-localisation de Bax avec COX IV, une protéine spécifique de la mitochondrie (**B**). Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires. Ctrl : contrôle ; nime : nimésulide; VP16 : étoposide

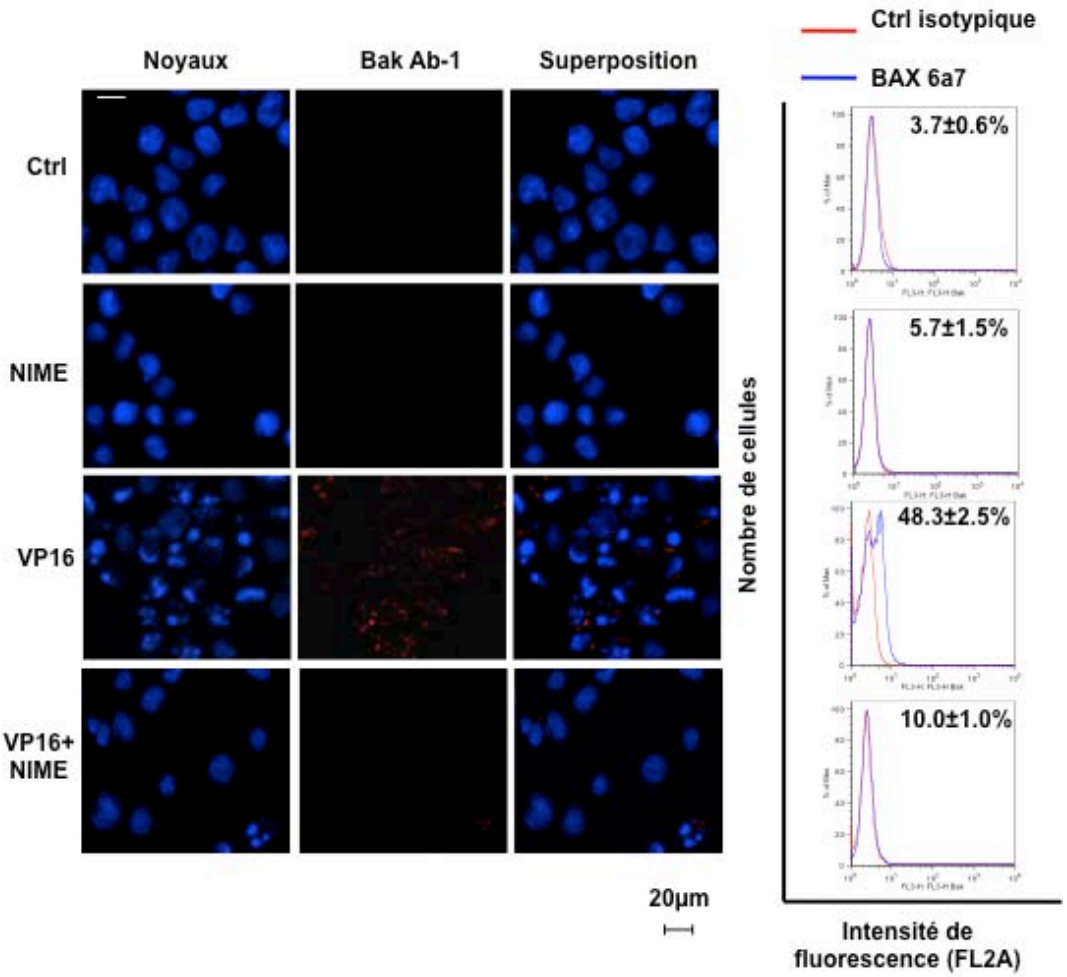


Figure 63 : Etude de l'effet du nimésulide sur l'activation de Bak induite par l'étoposide

Les cellules U937 ont été prétraitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10-100µM), puis exposées pendant 5h à l'étoposide (100µM). L'activation de Bak a été évaluée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique de la forme active de Bak (Ab-1). Le noyau des cellules a été marqué au Hoechst 33342. Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires. Ctrl : contrôle ; NIME : nimésulide ; VP16 : étoposide

L'activation des protéines Bax et Bak, nécessaires à l'induction de l'apoptose, est régulée par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*p.ex.*, Bcl-2, Bcl-xL) (Burlacu 2003). Il est possible que les inhibiteurs de COX-2 induisent l'expression de ces facteurs. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'activation de Bax, nous avons évalué l'expression des marqueurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL dans les cellules U937 par Western blot (Figure 64). Ces protéines sont connues pour interagir directement avec Bax ou en induisant son inactivation (Burlacu 2003; Billen, Kokoski et al. 2008). Cependant, l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL dans les cellules traitées par le nimésulide seul (10-100µM) pendant 24h n'est pas modifiée. La même expérience a été réalisée pour le NS-398 et nos résultats montrent que le traitement n'affecte pas l'expression de ces protéines anti-apoptotiques (Figure 64).

Nous avons montré précédemment que l'apoptose extrinsèque n'est pas affectée par les inhibiteurs de COX-2. La voie apoptotique mitochondriale peut être activée par la voie extrinsèque *via* le clivage de la protéine Bid qui conduit à l'activation des protéines Bax et Bak pour renforcer la réponse apoptotique (Henshall, Bonislawski et al. 2001). Nous avons confirmé ces données pour FasL par un immunomarquage pour la forme active de Bax et Bak (Figure 65). Nous avons ainsi remarqué que le traitement par le nimésulide ou le NS-398 n'affecte pas l'activation de ces deux protéines par FasL. L'apoptose induite par FasL n'est donc pas inhibée par le nimésulide et le NS-398. L'effet anti-apoptotique des inhibiteurs de COX-2 n'affecte donc que l'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques qui agissent en déclenchant la voie intrinsèque (apoptose induite par un stress). D'autre part, ces résultats montrent que les inhibiteurs de COX-2 n'affectent pas directement l'activation de Bax et de Bak. L'effet chimioprotecteur observé précédemment doit donc intervenir au niveau d'événements plus précoces.

Nos résultats montrent que les inhibiteurs de COX-2 préviennent l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, induite par l'étoposide. Cet effet est responsable de l'inhibition de la perte du potentiel membranaire mitochondrial et de la libération de cytochrome c par la mitochondrie observée précédemment. Donc, les inhibiteurs de COX-2 affectent l'apoptose intrinsèque à un stade encore plus précoce.

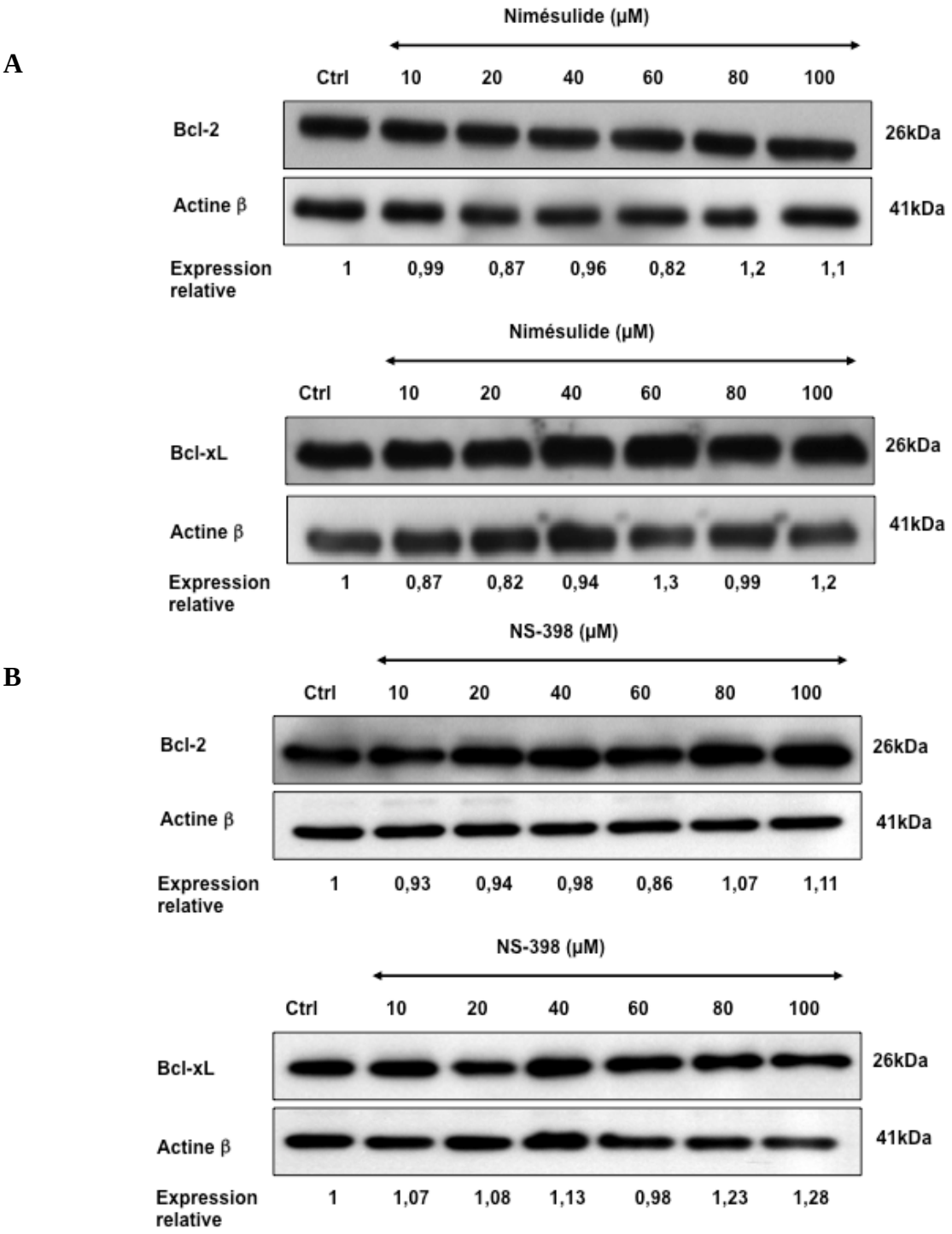


Figure 64: Etude de l'effet du nimésulide sur l'expression de protéines anti-apoptotiques

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10-100µM). Puis l'expression des protéines Bcl-xL et Bcl-2 a été étudiée par Western Blot. L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires.

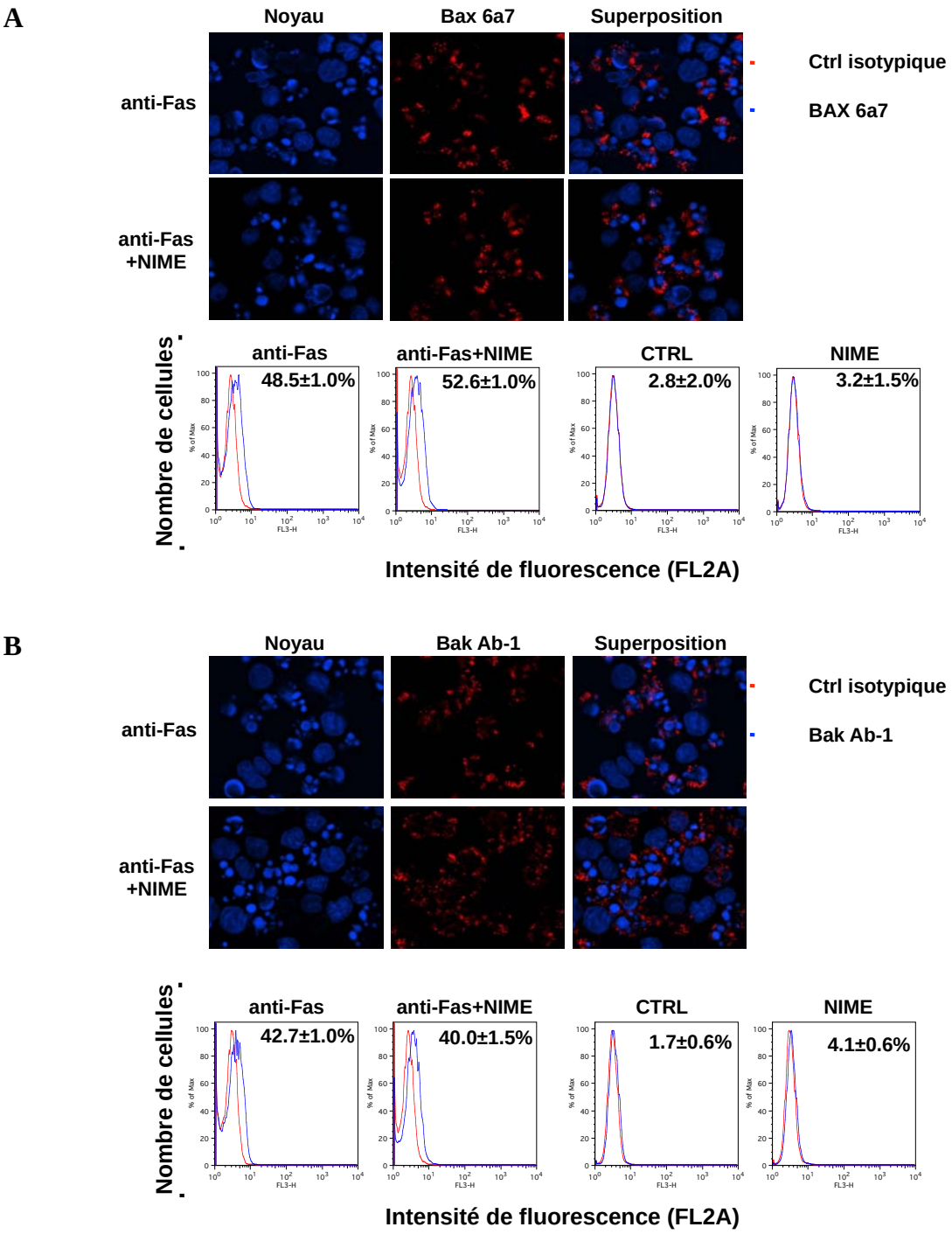


Figure 65 : Effet du Nimésulide sur l'activation de Bax et Bak induite par FasL

Les cellules U937 ont été exposées pendant 24h au nimésulide (100µM) puis exposées pendant 16h à FasL (50ng/mL). L'activation des protéines Bax (**A**) et Bak (**B**) a été évaluée par immunofluorescence. Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires.

4.4.8 Effet du nimésulide sur l'activation de JNK 1 et 2/3 et p38MAPK, induite par l'étoposide

Les résultats précédents nous montrent que les inhibiteurs de COX-2 inhibent l'apoptose intrinsèque induite par des agents chimiothérapeutiques. Par ailleurs, les inhibiteurs de COX-2 n'affectent pas l'apoptose extrinsèque induite par FasL ou le TNF-α. L'apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques peut passer par l'activation de JNK pour induire l'apoptose (Adler *et al.* 1999). Les JNKs interviennent à un stade précoce de l'induction d'apoptose en induisant la phosphorylation activatrice de protéines pro-apoptotiques comme Bax par exemple, ou encore en phosphorylant des protéines anti-apoptotiques telle que Bcl-xL ou Bcl-2, conduisant à une suppression de leurs fonctions anti-apoptotiques (Basu and Haldar 2003; Kanda and Miura 2004 ; Wei *et al.* 2008).

Nous avons étudié la phosphorylation des JNK 1 et 2/3. Nous avons traité les cellules U937 pendant 24h par du nimésulide (10-40μM), puis nous avons induit l'apoptose avec de l'étoposide (100μM) pendant 1h, 2h et 3h. L'expression de JNK 1 et JNK 2/3 et de leurs formes phosphorylées a ensuite été étudiée par Western blot. Nous avons ainsi remarqué, une augmentation des formes phosphorylées de JNK 1 et 2/3 dès 1h de traitement et qui est encore plus importante pour 2h et 3h de traitement après le traitement par l'étoposide seul. Pour les cellules qui ont subi un prétraitement préalable par le nimésulide, nous avons remarqué que les phosphorylations de JNK 1 et 2/3 induites par l'étoposide sont complètement inhibées. Le niveau d'expression de JNK n'est pas modifié avec les différents traitements. Des résultats identiques ont été obtenus en étudiant aussi la phosphorylation de c-Jun, une des cibles de JNK (Davis 1995). Ces résultats nous montrent donc que l'apoptose induite par l'étoposide passe par une activation des JNK 1, 2/3, qui est inhibé en présence de nimésulide. De même, nous avons étudié la phosphorylation de p38MAPK, qui joue aussi un rôle important dans l'apoptose en phosphorylant des protéines pro- et anti-apoptotiques. Les résultats de cette analyse nous ont montré que l'étoposide conduit à une phosphorylation de p38MAPK sur les résidus thréonine 180 et tyrosine 182 (Figure 66). Le nimésulide inhibe l'activation de cette kinase. Par ailleurs, le niveau d'expression de p38 non phosphorylé n'est pas modifiée.

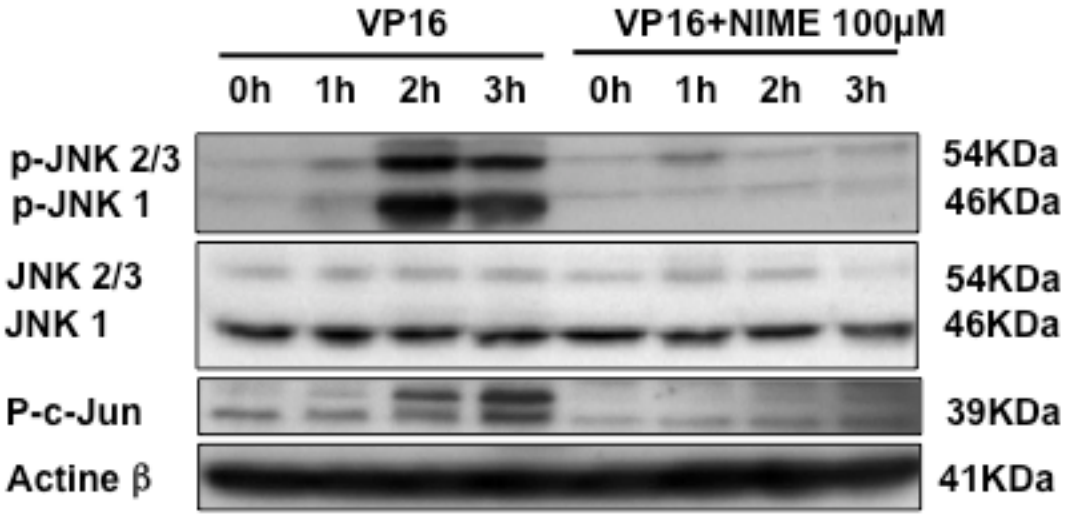
4.4.9 Effet du nimésulide sur la protéolyse de Bcl-2 induite par l'étoposide

Les JNK et p38MAPK jouent un rôle dans l'apoptose en phosphorylant des protéines anti-apoptotiques telle que Bcl-2 et Bcl-xL. Ces phosphorylations permettent, d'une part d'inhiber l'interaction entre Bcl-2/Bcl-xL et les protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak et d'autre part, permettent leur reconnaissance par des ubiquitine ligases qui vont initier leur dégradation par le protéasome 26S (Kanda and Miura 2004 ; Wei, Sinha et al. 2008).

Les résultats précédents nous ont montré que durant l'apoptose induite par l'étoposide, il y a phosphorylation des JNK 1, 2/3 et de p38 MAPK. Ces kinases sont connues dans la littérature pour phosphoryler des protéines impliquées dans l'apoptose comme par exemple Bcl-2, Bcl-xL. Ces phosphorylations sont nécessaires pour leur dégradation par le protéasome 26S. La capacité des inhibiteurs de COX-2 à inhiber l'activation des JNK et p38MAPK induite par l'étoposide, pourrait par conséquent se traduire par une inhibition de la phosphorylation et donc par la dégradation de ces protéines. Suivant cette hypothèse, nous avons traité les cellules U937 pendant 24h par le nimésulide à différentes concentrations (10, 20, 40, 60, 80 et 100µM). Puis nous avons induit l'apoptose à l'aide de l'étoposide (100µM). Le niveau d'expression de Bcl-2 et Bcl-xL a ensuite été étudié par Western Blot. L'expérience nous a montré que le nimésulide n'affecte pas l'expression de Bcl-2 et que l'étoposide seul conduit à un clivage de la protéine Bcl-2 (26 et 22 kDa). Par contre, si les cellules sont prétraitées par le nimésulide avant l'induction d'apoptose, alors le clivage de Bcl-2 est inhibé. Cet effet commence dès 10µM. Pour 100µM, le clivage de Bcl-2 est complètement inhibé. Pour Bcl-xL, des résultats similaires ont été obtenus, avec une diminution de l'expression de cette protéine par l'étoposide seul et une inhibition de cet effet avec le prétraitement par le nimésulide. Le traitement par le nimésulide seul n'affecte pas l'expression de Bcl-2 ou de Bcl-xL (Figure 67).

Les inhibiteurs de COX-2 inhibent l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques à un stade très précoce, avant l'activation des kinases JNKs et p38MAPK.

A



B

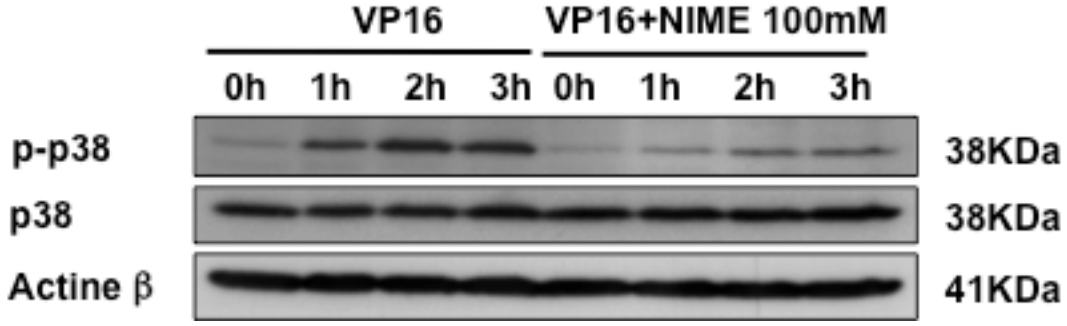
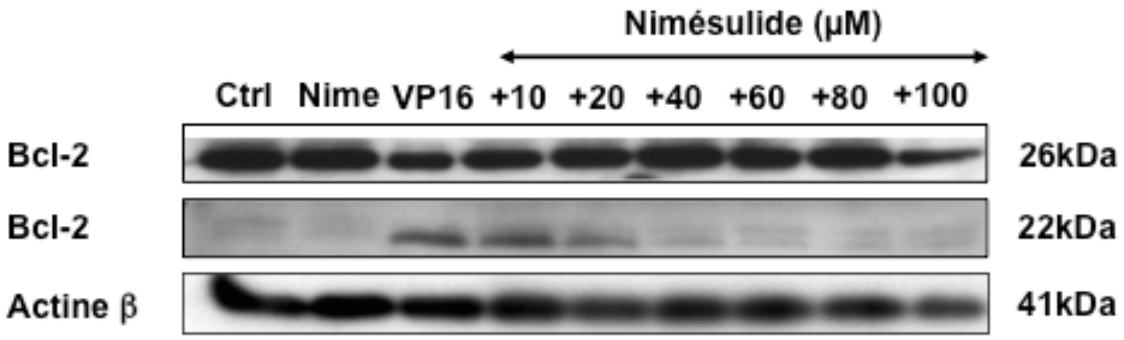


Figure 66 : Effet du nimésulide sur l'activation des JNK 1, 2/3 et de p38MAPK induite par l'étoposide

Les cellules U937 ont été traitées par l'étoposide (VP16 ; 100µM) pendant 3h ou prétraitées par le nimésulide (100µM) pendant 24h, puis de l'étoposide pendant 3h. L'expression de JNK1, 2/3 et les formes phosphorylées de ces protéines, ainsi que de p38 et p38 phosphorylé sur la thréonine 180 et sur la tyrosine 182 a été évaluée par Western Blot. L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires. Nime : nimésulide ; JNK : c-jun N-terminal kinase ; VP16 : étoposide.

A



B

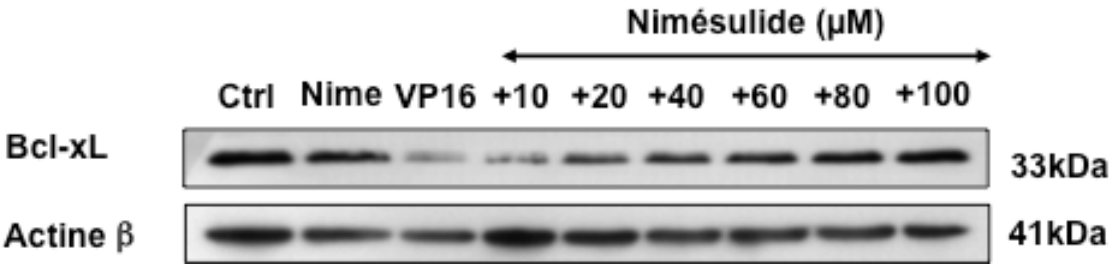


Figure 67 : Effet du nimésulide sur l'expression et la protéolyse de Bcl-2 induite par l'étoposide

Les cellules U937 ont été traitées par l'étoposide (VP16 ; 100µM) pendant 3h ou prétraitées par le nimésulide (100µM) pendant 24h, puis de l'étoposide pendant 3h. L'expression des protéines Bcl-2 (**A**) et Bcl-xL (**B**) a été évaluée par Western Blot. L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats sont représentatifs de deux expériences similaires.

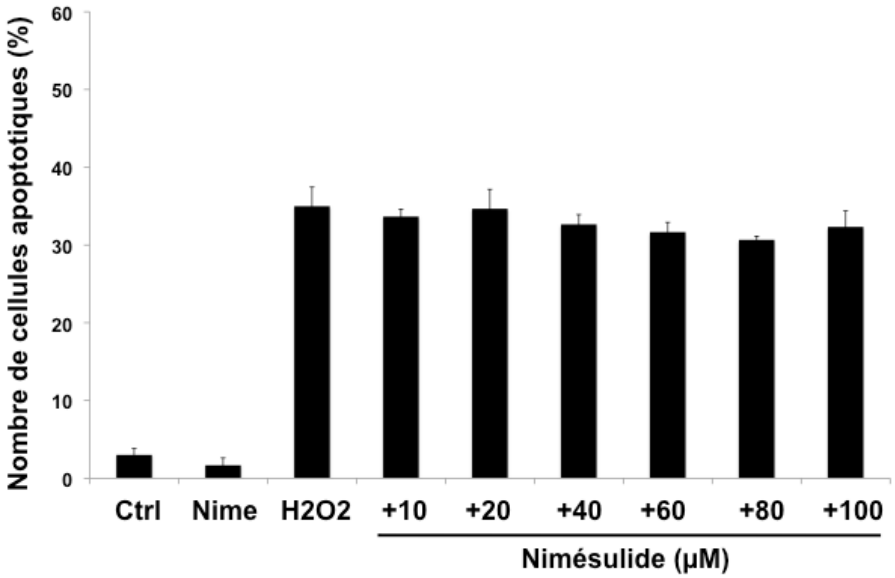
4.4.10 Les inhibiteurs de COX-2 préviennent les altérations de l'ADN induites par l'étoposide

La chimiorésistance pourrait être la conséquence d'une altération de l'internalisation ou de l'accumulation des agents chimiothérapeutiques dans les cellules et donc à une diminution du taux intracellulaire d'agent chimiothérapeutiques et donc une survie de ces cellules (Bodo *et al.* 2003 ; Huang *et al.* 2006 ; Steinbach *et al.* 2007).

Afin d'étudier cet aspect, nous avons évalué l'effet du nimésulide et de NS-398 sur l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive de l'oxygène qui induit aussi l'apoptose par la voie intrinsèque. Le peroxyde d'hydrogène peut entrer librement dans les cellules, sans passer par des systèmes d'import particulier. Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène n'est pas la cible des protéines de la famille ABC et ne peut donc pas être rejeté en dehors des cellules. Ainsi, nous avons traité les cellules U937 pendant 24h par différentes concentrations d'inhibiteurs (nimésulide ou NS-398 de 10 à 100µM), puis traitées pendant 1h par 500µM de peroxyde d'hydrogène (Colussi *et al.* 2000). Le milieu de culture a ensuite été retiré, les cellules ont été lavées puis replacées dans un nouveau milieu de culture ne contenant pas de peroxyde d'hydrogène pendant 8h. L'apoptose a ensuite été évaluée par observation de la morphologie nucléaire grâce à un marquage au Hoechst 33342 (Figure 68). Nous avons ainsi constaté que le pourcentage d'apoptose des cellules U937 (41,67 ± 1,79%) n'est pas modifié par le traitement avec le nimésulide ou le NS-398.

Les résultats précédents nous indiquent donc que la chimiorésistance observée dans les cellules U937 après traitement par les inhibiteurs de COX-2 n'est pas lié au mécanisme même de l'apoptose intrinsèque mais pourrait être liée à une capacité des inhibiteurs de COX-2 à diminuer la concentration intracellulaire en agents chimiothérapeutiques. Un tel effet devrait s'accompagner d'une diminution des altérations de l'ADN induites par ces agents chimiothérapeutiques. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la phosphorylation de l'histone H2AX sur la serine 139 qui se produit lors de cassures double brins de l'ADN et permet l'activation de H2AX nécessaire aux mécanismes de réparation de l'ADN (Kinner, Wu et al. 2008; Darzynkiewicz, Halicka et al. 2009).

A



B

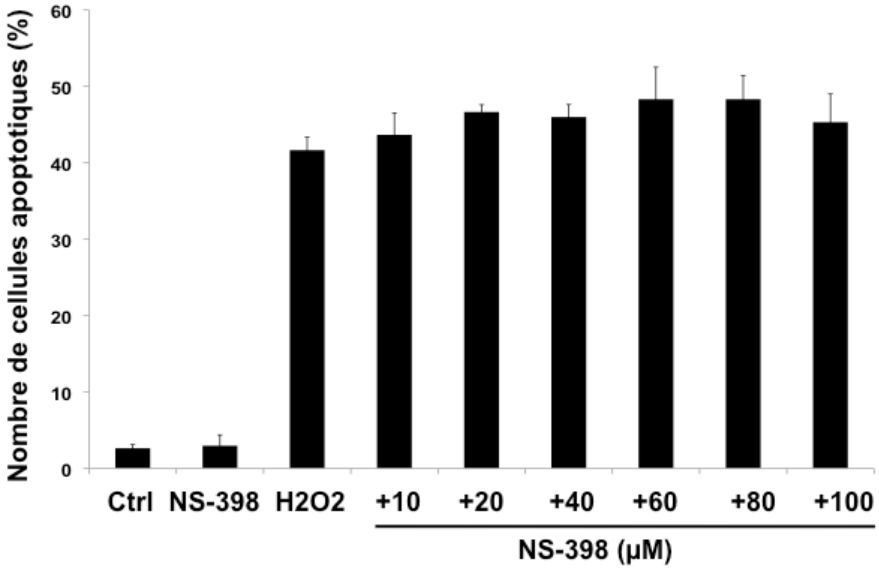


Figure 68 : Effet du Nimésulide et du NS-398 sur l'apoptose induite par le H_2O_2

Les cellules U937 ont été exposées pendant 24h à 100µM de nimésulide (**A**) ou 100µM de NS-398 (**B**) puis exposées pendant 1h à 500µM de H_2O_2. Le milieu de culture des cellules a ensuite été changé par du milieu sans H_2O_2 et l'apoptose a été évaluée par morphologie nucléaire après 8h. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard).

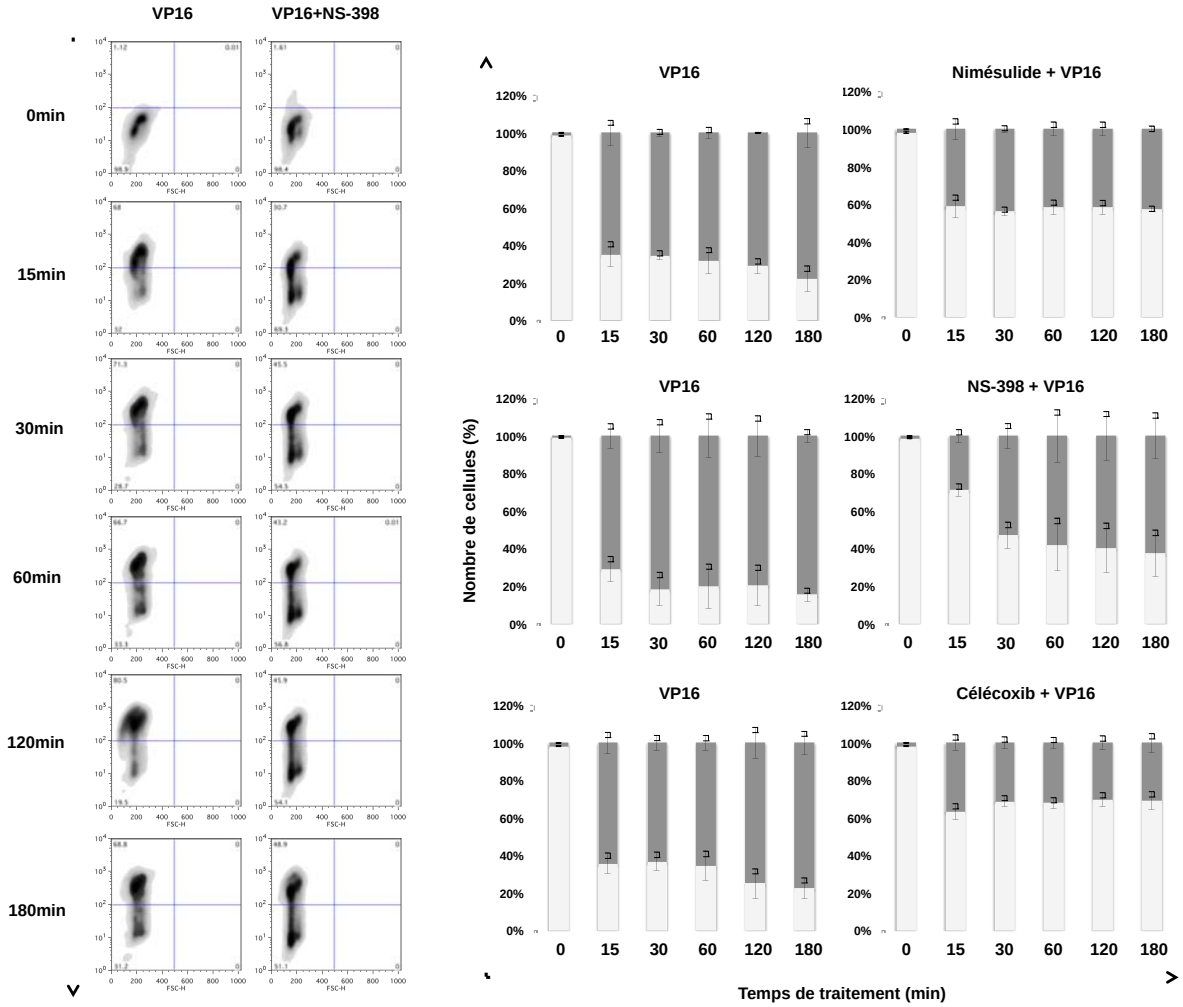


Figure 69 : Effets des inhibiteurs de COX-2 sur la phosphorylation de H2AX

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h par le nimésulide (100µM), puis traitées par l'étoposide (100µM) pendant une période de 180 min. La phosphorylation de H2AX sur la sérine 139 a été étudiée par immunofluorescence, par cytométrie en flux après 15, 30, 60, 120 et 180 min de traitement avec l'étoposide. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). VP16 : étoposide

L'étude de la phosphorylation de H2AX par cytométrie en flux à l'aide d'un immunomarquage spécifique de la forme phosphorylée de cette protéine (Figure 69), nous a montré que l'induction de l'apoptose par l'étoposide conduit à une forte phosphorylation de H2AX dès 15 min de traitement dans 64,83 ± 6,86 % des cellules, Cet effet s'accentue en fonction du temps et devient maximal pour 180 min (78,77 ± 6,88% des cellules présentent une forte phosphorylation de H2AX). Le prétraitement des cellules avec le nimésulide (100µM), le NS-398 (100µM) ou le célécoxib (40µM) prévient cette activation dès 15 min de traitement, ainsi que pour des temps plus longs. Pour 180 min, le pourcentage de cellules avec une activation de H2AX est de 42,56 ± 1,56% pour le nimésulide, 62,54 ± 12,33% pour le NS-398 et 30,93 ± 4,94 % pour le célécoxib. Nos résultats montrent donc que les inhibiteurs de COX-2 préviennent les altérations de l'ADN induites par l'étoposide.

4.4.11 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur des protéines de transport des agents chimiothérapeutiques

Récemment, il a été montré que le célécoxib inhibe l'apoptose induite par le cisplatine dans un modèle de cancer de l'œsophage (Yu *et al.* 2011). Cet effet a été associé à une diminution de l'expression de CTR1 (copper transporter 1), une protéine qui permet l'importation des agents chimiothérapeutiques dans la cellule. Afin de savoir si un effet similaire est activé dans notre modèle, nous avons analysé l'expression de CTR1 par Western Blot après 24h de traitement par du nimésulide, du NS-398 ou du célécoxib (Figure 70). Nos résultats n'ont cependant révélé aucune modulation de l'expression de cette protéine.

Nous avons vérifié si la protection contre l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques passe par l'expression de protéines impliquées dans le rejet des agents chimiothérapeutiques en dehors des cellules. Dans un premier temps, nous avons réalisé un test d'efflux de la rhodamine 123, une molécule fluorescente qui est rejetée en dehors des cellules par la glycoprotéine-P et d'autres protéines de la famille ABC comme par exemple les MRPs (Bodo, Bakos et al. 2003 ; Huang and Sadee 2006). Les cellules U937 ont été traitées par 10µM de rhodamine 123. La fluorescence à t=0 a été mesurée par cytométrie en flux puis les cellules ont été lavées et replacées dans un milieu dépourvu de rhodamine 123 pendant 6h avant de mesurer la fluorescence par cytométrie en flux (Figure 71). Nous avons observé une diminution de la fluorescence de 45,80 ± 6,91% dans les cellules U937 traitées par le nimésulide, contre 9,49 ± 1,92% pour les cellules non traitées.

Nos résultats sont compatibles avec un rejet de la rhodamine 123 en dehors des cellules par des protéines impliquées dans le rejet des agents chimiothérapeutiques en dehors des cellules. Les protéines de la famille ABC sont connus pour cette capacité et induire une chimiorésistance dans de nombreux modèles tumoraux (Bodo, Bakos et al. 2003 ; Huang and Sadee 2006). Nous avons focalisé principalement notre attention sur deux membres de cette famille, MDR1 et MRP1 (Luqmani 2005). Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h par le nimésulide ou le NS-398 aux concentrations 10, 40 et 100µM. L'expression de MRP1 et de MDR1 a été analysée par PCR en temps réel (Figure 72). Les résultats nous montrent que les deux molécules conduisent à une augmentation de l'expression de ces deux gènes et cet effet est d'autant plus important que la concentration est importante. Pour MDR-1, une augmentation d'un facteur 3.09 ± 1,02 a été observée pour 100µM de nimésulide. Pour MRP-1, le facteur d'induction s'élève à 1.55 ± 0.25. Le NS-398 augmente l'expression de MDR-1 d'un facteur 3,83 ± 0,11 et de MRP-1, d'un facteur 2,11 ± 0,11. Le célécoxib augmente aussi l'expression de MDR-1 dans les cellules. L'induction est plus importante que celle observée avec le nimésulide ou le NS-398, puisque le facteur d'induction pour la concentration maximale est de 34,74 ± 16,95%.

Ces résultats suggèrent que ces deux protéines pourraient être impliquées dans le phénomène de chimiorésistance des U937 induit par les inhibiteurs de COX-2. Afin de répondre à cette question, nous avons analysé l'expression des protéines MRP1 et de la glycoprotéine-P (MDR1) dans les cellules U937 traitées par le nimésulide ou par le célécoxib, par cytométrie en flux (Figure 73). Cependant notre analyse n'a pas révélée de modifications significatives du profil d'expression.

Les inhibiteurs de COX-2 contrecarrent l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques en réduisant la concentration intracellulaire de ces molécules. Cet effet conduit à une diminution des altérations de l'ADN induites par ces agents. Cependant, l'effet n'est pas associé à une augmentation de l'expression de protéines particulièrement connues pour conduire à une chimiorésistance, notamment CTR1, MRP1 ou MDR1. Nos résultats suggèrent donc que d'autres mécanismes comme la détoxification cellulaire par exemple, pourrait être impliquée ou bien que d'autres protéines de la famille ABC sont impliquées dans la chimiorésistance induite par les inhibiteurs de COX-2.

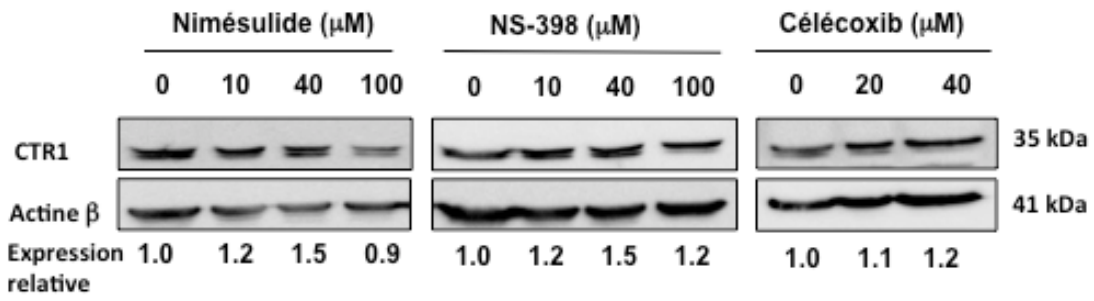


Figure 70 : Effets des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de CTR1

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide, de NS-398 (10-100µM) ou de célécoxib (20-40µM). L'expression de CTR1 a ensuite été analysée par Western Blot. L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats sont représentatifs de trois expériences similaires.

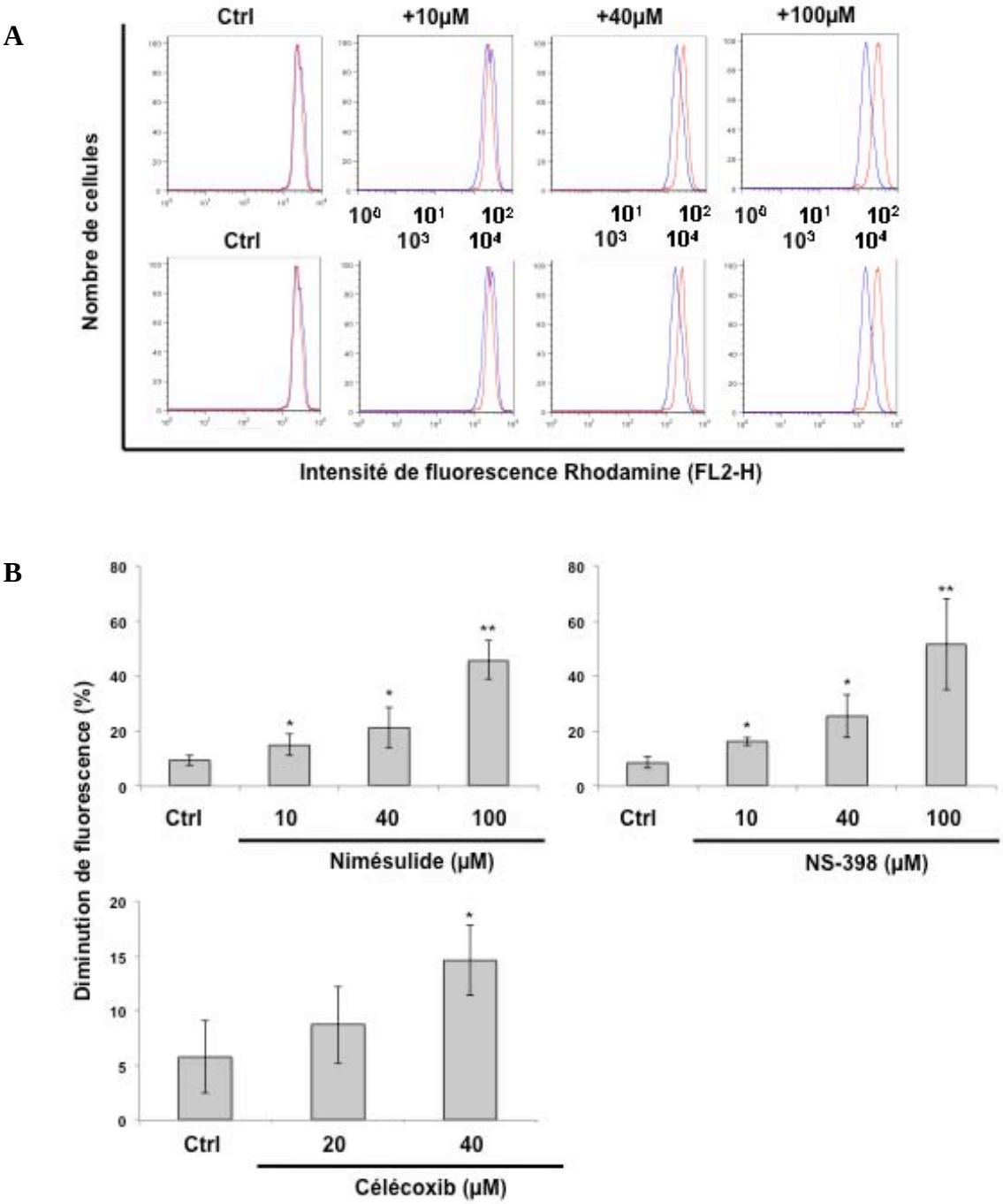
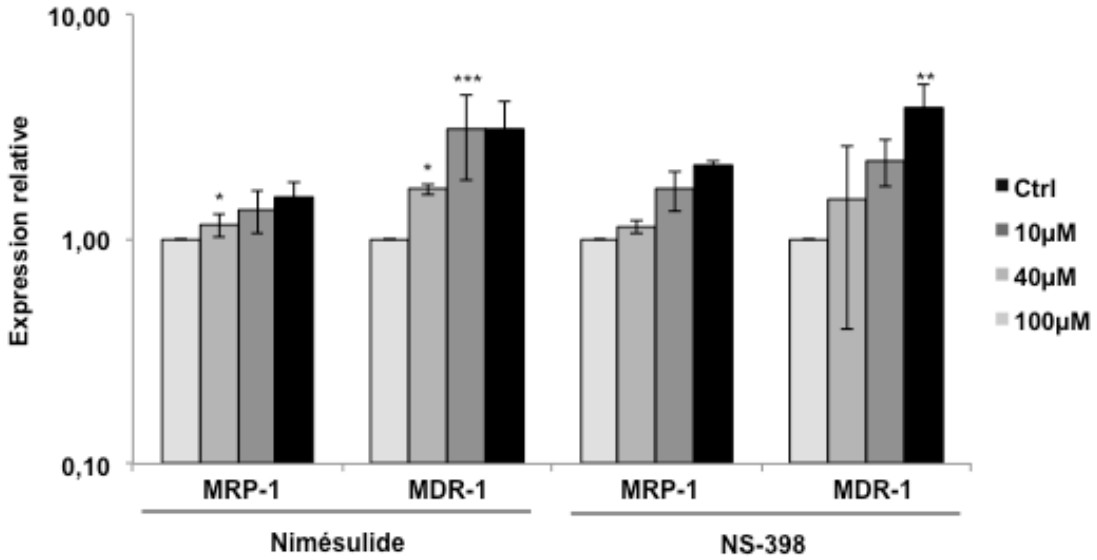


Figure 71 : Effets des inhibiteurs de COX-2 du nimésulide et du NS-398 sur le niveau intracellulaire de rhodamine 123

Les cellules U937 ont été traitées pendant 24h par différentes concentrations de nimésulide (10-100µM) puis 10µM de rhodamine 123. Après lavage des cellules et re-suspension dans un milieu dépourvu de rhodamine 123 pendant 6h, la fluorescence dans les cellules a été analysée par cytométrie en flux (**A**, **B**). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;*** : $p < 0,001$.

A



B

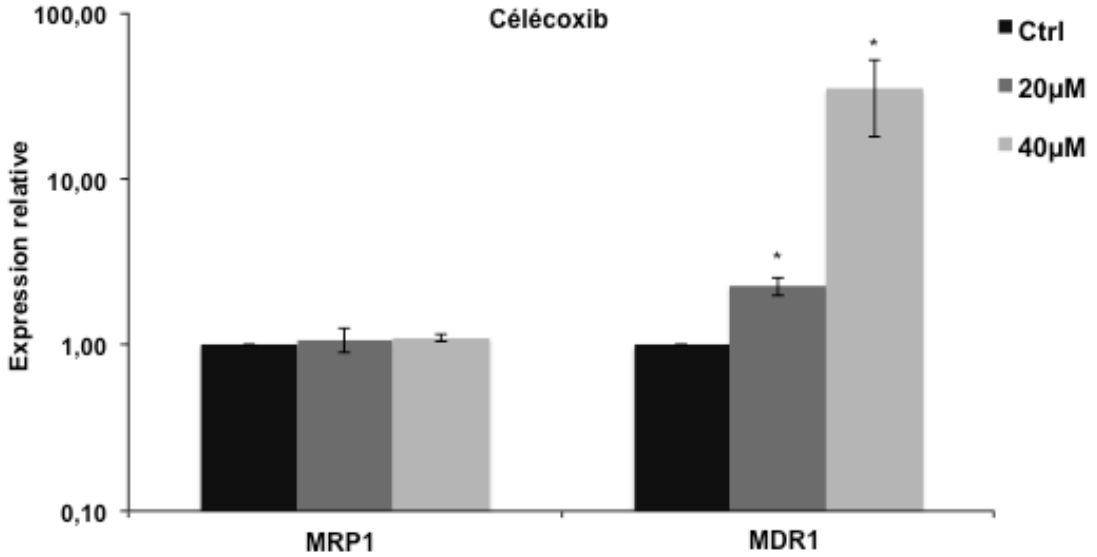


Figure 72 : Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de MRP-1 et de MDR-1

Les cellules U937 ont été exposées pendant 24h à différentes concentrations de nimésulide (10-100µM), de NS-398 (10-100µM) (**A**) ou de célécoxib (20-40µM) (**B**). L'expression de MDR-1 et de MRP-1 a été évaluée par PCR en temps réel. L'actine β a été utilisée comme gène de référence. Les résultats représentent la moyenne de quatre expériences ± DS (déviation standard). * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

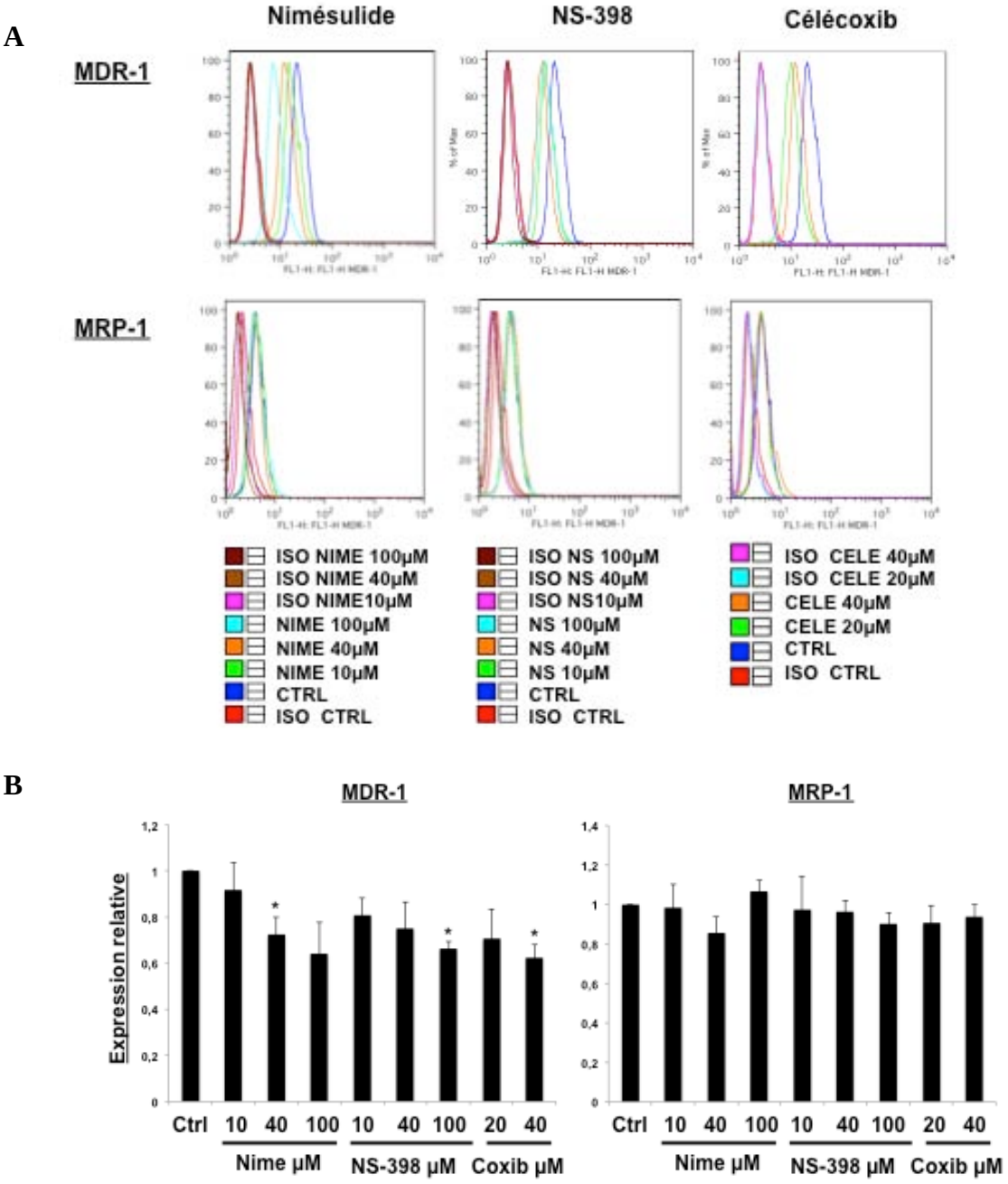


Figure 73 : Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de MDR-1 et MRP-1

Les cellules U937 ont été exposées pendant 24h à différentes concentrations de nimésulide, de NS-398 (10-100µM) ou de célécoxib (20-40µM). L'expression des protéines MDR-1 et MRP-1 a été évaluée par cytométrie en flux. Les profils obtenus sont représentés en **A** et les quantifications en **B**. Les résultats représentent la différence relative par rapport au contrôle. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard).

* : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;*** : $p < 0,001$.

4.4.12 Effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'autophagie

Plusieurs études ont montré que l'autophagie peut conduire à une chimiorésistance (Carew *et al.* 2007 ; Song *et al.* 2009). Par ailleurs, l'autophagie est aussi associée à une augmentation de l'activité β-gal du fait d'une augmentation de la masse lysosomiale (Gerland, Peyrol et al. 2003). Précédemment, nous avons observé l'apparition de vésicules positives pour la β-gal dans les cellules U937 traitées par les inhibiteurs de COX-2 (voir section 4.3.10) Nous avons donc vérifié si la chimiorésistance induite par les inhibiteurs de COX-2 était associée à une induction d'autophagie.

Nous avons dans un premier temps étudié la masse lysosomiale à l'aide d'un marquage au lysoTracker Red (Figure 74A). L'expérience nous a révélé une augmentation de la masse lysosomiale dès 40µM de nimésulide (35,79 ± 13,34%) et dès 10µM de célécoxib (102,90 ± 12,92%). Cette augmentation atteint 81,99 ± 38,71% pour 100µM de nimésulide et 266,41 ± 45,86% pour 40µM de célécoxib. Cet effet a été quantifié par cytométrie en flux (Figure 74B). Ces résultats confirment donc l'augmentation de l'activité β-gal observée précédemment.

L'autophagie est un phénomène qui nécessite la formation d'autophagolysosomes. Durant cette étape, une conversion de la protéine LC3-I (light-chain-3) en LC3-II, résultant de la fixation d'un phospholipide (phosphatidyléthanolamine) est réalisée (Maiuri, Zalckvar et al. 2007). Nous avons étudié la conversion de cette protéine par Western Blot, dans des cellules U937 traitées pendant 48h par du célécoxib (Figure 74C). L'analyse nous a révélé une conversion de LC3 à partir de 30µM. Ces résultats suggèrent que le célécoxib induit l'autophagie des cellules U937.

Notre étude a montré que les inhibiteurs de COX-2 contrecarrent l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques. Cet effet peut être la conséquence de plusieurs mécanismes comme discuté précédemment. Nos résultats ont montré ici que le célécoxib conduit à une induction d'autophagie dans les cellules U937. Cet effet pourrait expliquer la chimiorésistance induite par le célécoxib.

L'ensemble des résultats obtenus a été synthétisé dans la figure 75.

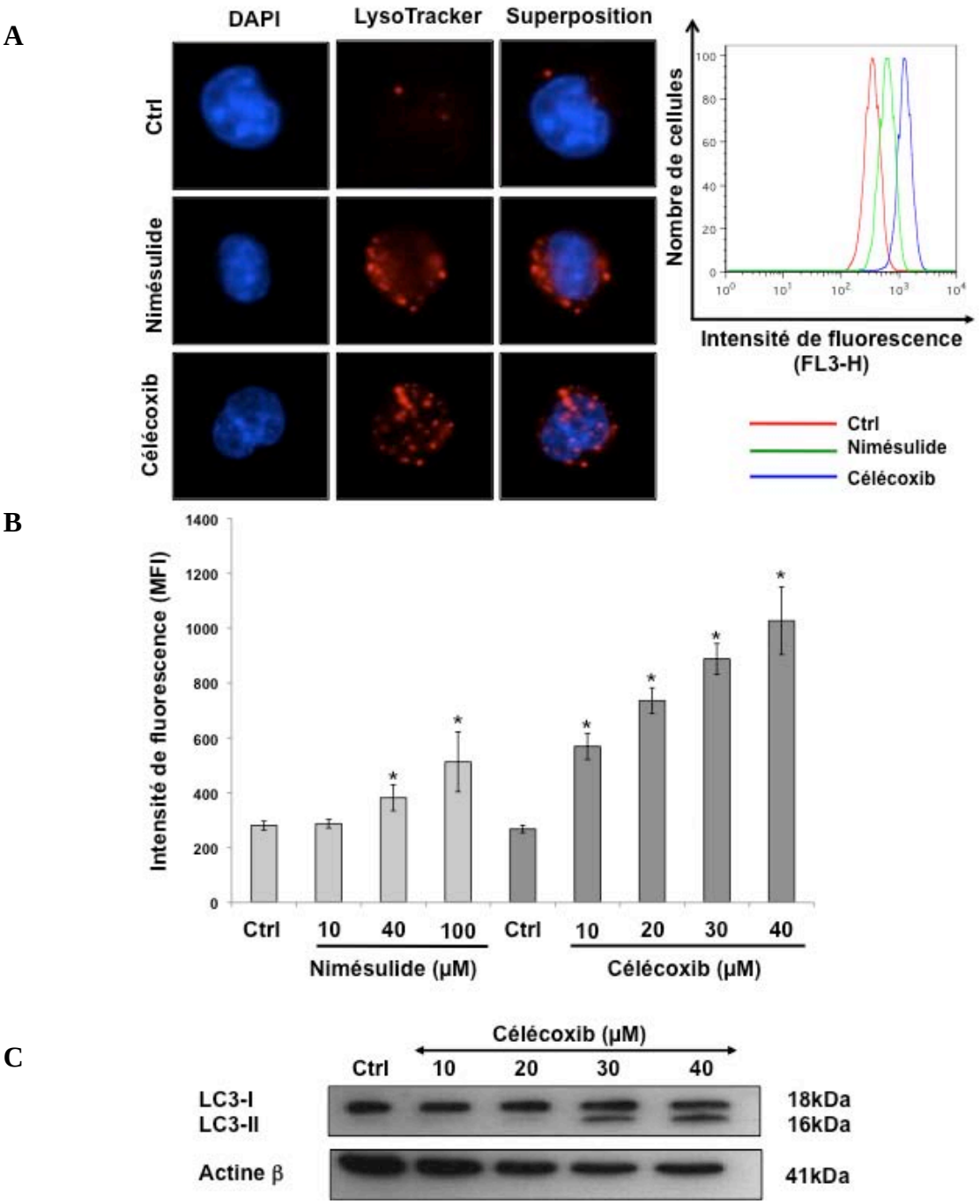


Figure 74 : Effet du nimésulide et du célécoxib sur la masse lysosomiale des cellules U937

Les cellules U937 ont été traitées pendant 48h par du nimésulide (100µM) ou du célécoxib (40µM). La masse lysosomiale a été étudiée par marquage au lysoTracker Red par microscopie et cytométrie en flux (**A** et **B**). La conversion de LC3 a été étudié par Western Blot sur les cellules U937 traitées 48h par du célécoxib (**C**). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

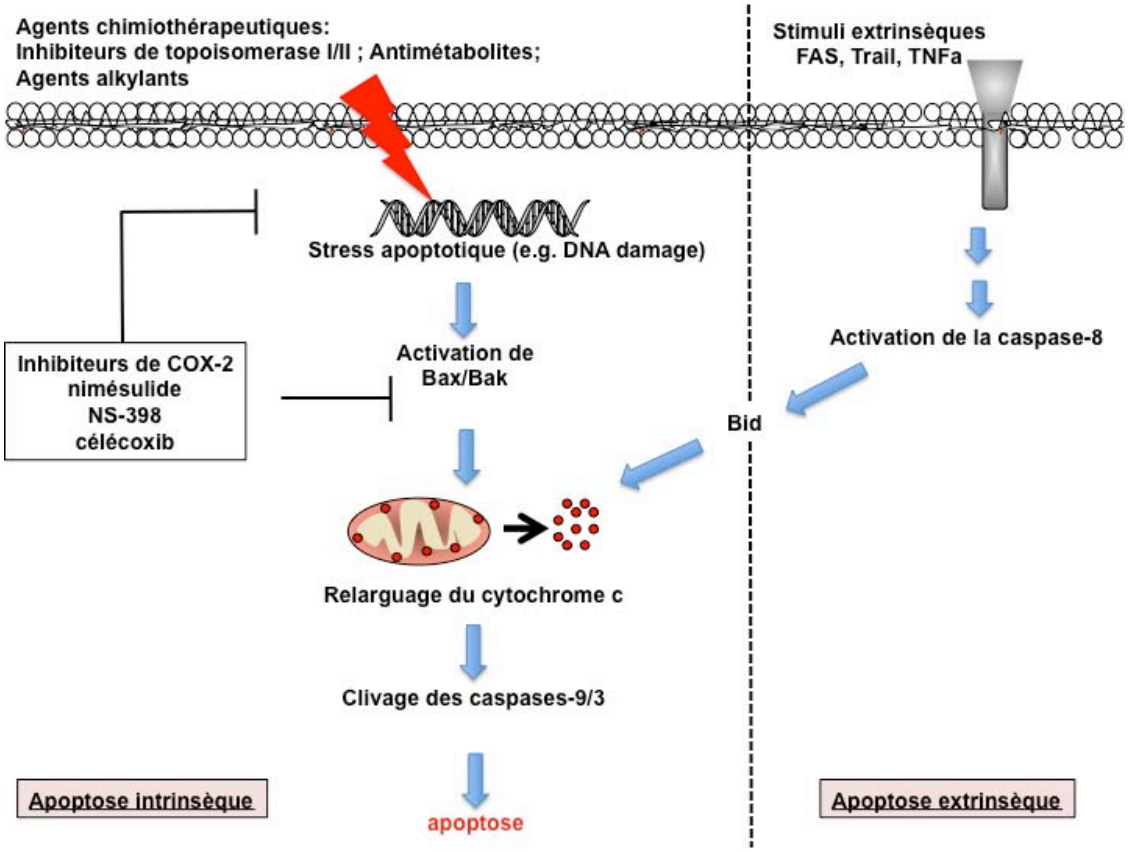


Figure 75 : Récapitulatif des résultats concernant l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose des cellules U937

Le schéma récapitule les effets des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose. Les inhibiteurs de COX-2 inhibent l'apoptose induite par plusieurs agents chimiothérapeutiques mais pas l'apoptose induite par des stimuli physiologiques (anti-Fas, TNFα, TRAIL). L'inhibition de l'apoptose intrinsèque se situe à un stade précoce de l'induction d'apoptose, avant l'activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak et suggère l'implication de mécanismes de chimiorésistance (*par exemple*, détoxification, autre membre de la famille ABC).

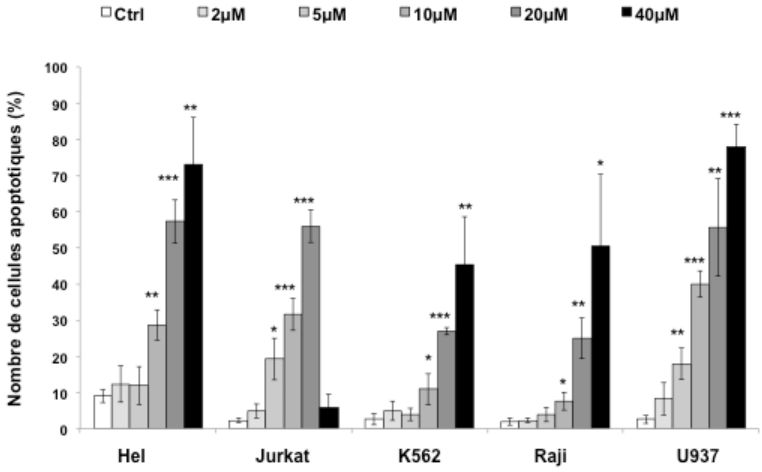
4.5 Effet de la curcumine et de la combinaison célécoxib/curcumine sur la prolifération et la survie de lignées cellulaires hématologiques.

Précédemment, nous avons montré que les inhibiteurs de COX-2 ont un effet bénéfique en inhibant la prolifération de différents types de cellules leucémiques. Cependant ces inhibiteurs rendent les cellules plus résistantes à l'apoptose induite par différents agents chimiothérapeutiques. Cet effet suggère donc que les inhibiteurs de COX-2 pourraient être utilisés en thérapie mais pas en combinaison avec la chimiothérapie. De nombreux composés d'origine naturelle ont montré une activité anti-inflammatoire, antitumorale et potentialisent la chimiothérapie et la radiothérapie dans plusieurs types de tumeurs (Schumacher *et al.* 2011 ; Shanmugam *et al.* 2011). Ces effets sont particulièrement connus pour le cancer du côlon, du sein mais aussi des leucémies. Ces substances naturelles sont présentes dans notre alimentation comme par exemple les isothiocyanates du choux (Brown *et al.* 2011), les lycopènes de la tomate (Kelkel *et al.* 2011) ou encore les organosulfures présent dans l'ail (Miroddi *et al.* 2011). D'autre part, ces molécules peuvent agir de manière additive ou synergique sur la prolifération ou l'apoptose de différents types de cellules tumorales. L'intérêt de cette stratégie combinatoire serait de limiter les effets secondaires associés aux inhibiteurs classiques de COX-2 comme par exemple les effets gastro-intestinaux ou encore les risques accrus d'infarctus du myocarde mais aussi d'augmenter le potentiel antitumoral de ces substances. Dans cette partie, nous nous sommes particulièrement intéressés à la curcumine (ou diféruloylméthane), un polyphénol issu du rhizome de *Curcuma longa* (Kelkel, Jacob et al. 2010) et sa combinaison avec le célécoxib.

4.5.1 Effet de la curcumine sur l'apoptose des lignées cellulaires hématologiques.

Nous avons dans un premier temps étudié l'effet de la curcumine sur l'apoptose de nos différentes lignées cellulaires. Les cellules Hel, Jurkat, K562, Raji et U937 ont été traitées par différentes concentrations de curcumine (2, 5, 10, 20 et 40µM) pendant 24h. L'apoptose a ensuite été évaluée par morphologie nucléaire (Figure 76). Nous avons ainsi observé que la curcumine induit l'apoptose des différentes lignées cellulaires.

A



B

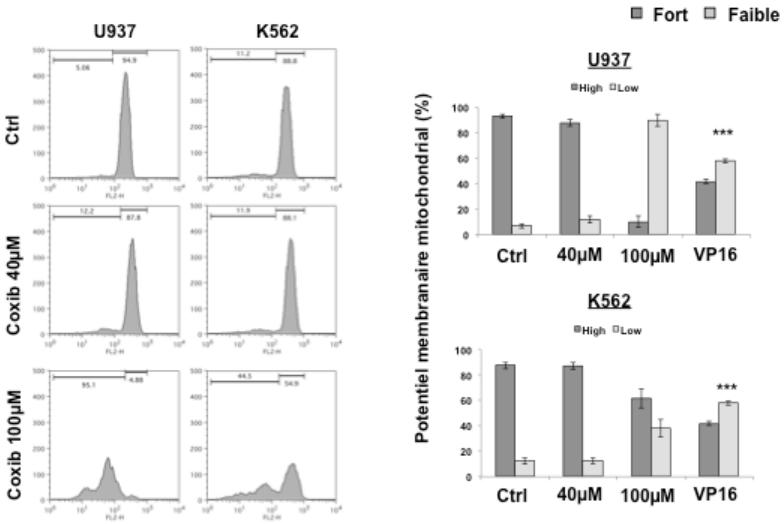
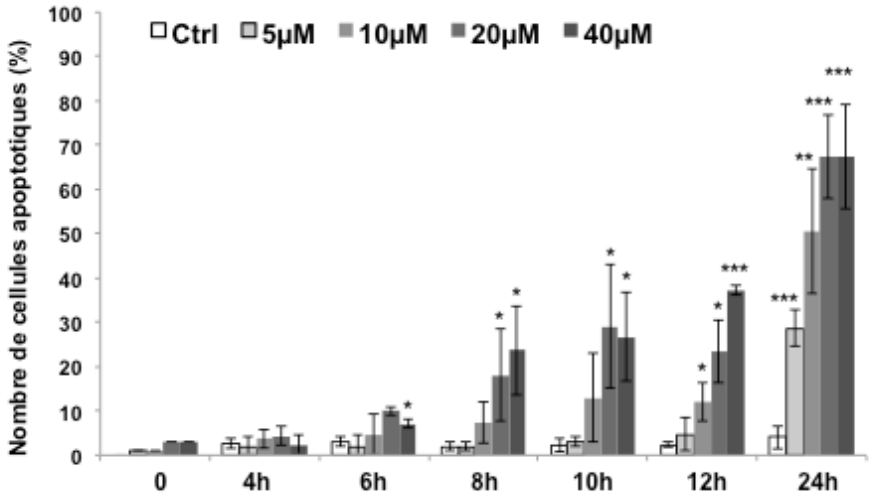


Figure 76 Etude de l'effet de la curcumine sur l'apoptose des différentes lignées hématopoïétiques

Les cellules Hel, Jurkat, K562, Raji et U937 ont été traitées par différentes concentrations de curcumine (2, 5, 10, 20, 40µM). Après 24h de traitement, l'apoptose a été estimée par morphologie nucléaire par microscopie à fluorescence à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342 et par l'analyse du potentiel membranaire mitochondriale par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage au MitoTracker Red. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Les cellules U937 traitées pendant 5h par l'étoposide (VP16) ont été utilisées comme contrôle positif. Ctrl : cellules non traitées ; Coxib : célécoxib ; VP16 : étoposide. * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

A



B

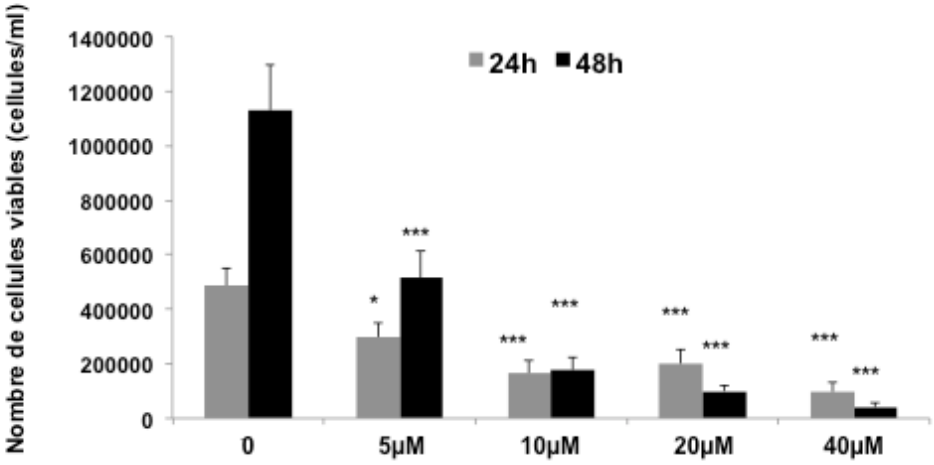


Figure 77 Etude de l'effet de la curcumine sur l'apoptose des différentes lignées hématopoïétiques

Les cellules U937 ont été traitées par différentes concentrations de curcumine (0, 5, 10, 20, 40µM) pendant 4h, 6h, 8h, 10h, 12h et 24h. L'apoptose a été estimée par l'étude de la morphologie nucléaire par microscopie à fluorescence, à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342 (**A**). La prolifération des cellules U937 a été estimée par une coloration d'exclusion au bleu de trypan après 24h et 48h de traitement (**B**). Les comptages ont été effectués à l'aide d'une coloration d'exclusion au bleu de trypan et une cellule de Malassez Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Les cellules U937 sont les plus sensibles au traitement et les cellules K562 les plus résistantes. Pour cette raison, nous focaliserons la suite de notre étude sur ces deux modèles.

Nous avons ensuite étudié l'effet de la curcumine sur la prolifération des cellules U937 après 24h de traitements à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de trypan (Figure 77). Nous avons ainsi remarqué que la curcumine inhibe la prolifération des cellules U937 dès 5µM de traitement.

Afin de mieux comprendre comment la curcumine induit l'apoptose, nous avons sélectionné les cellules U937 qui sont les plus sensibles à la curcumine et nous avons étudié l'effet de cette molécule sur la distribution des cellules dans le cycle cellulaire (Figure 78). Après 24h, à 10µM, nous avons observé une accumulation des cellules en phase G2/M (25,27 ± 4,99% contre 15,57 ± 0,81% pour le contrôle) ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules hypodiploïdes, c'est-à-dire du nombre de cellules apoptotiques (10,7 ± 2,35 % contre 2,82 ± 1,34% pour le contrôle). Après 48h de traitement, l'induction d'apoptose observée à cette concentration est plus importante (23,93 ± 5,01%), ce qui montre que l'apoptose est ici provoquée par un blocage du cycle cellulaire au niveau de la transition G2/M du cycle cellulaire. Au delà de 10µM, une forte diminution du nombre de cellules a pu être observée dans toutes les phases du cycle cellulaire associée à une forte augmentation du nombre de cellules apoptotiques pour 24h et 48h de traitement. Pour 40µM, le pourcentage d'apoptose atteint 95,6 ± 4,19%. L'accumulation des cellules en phase G2/M peut être la conséquence d'une perturbation de la mitose. Afin d'élucider cette question, nous avons réalisé une coloration de May-Grunwald Giemsa sur des cellules U937 traitées pendant 24h par 10µM de curcumine. Nous avons ainsi mis en évidence une accumulation de cellules mitotiques par le traitement. Les cellules ont un aspect de cellules en prophase/métaphase du cycle cellulaire.

La curcumine induit l'apoptose des cellules U937 en perturbant la transition G2/M du cycle cellulaire et induit une accumulation de cellules mitotiques.

A

B

C

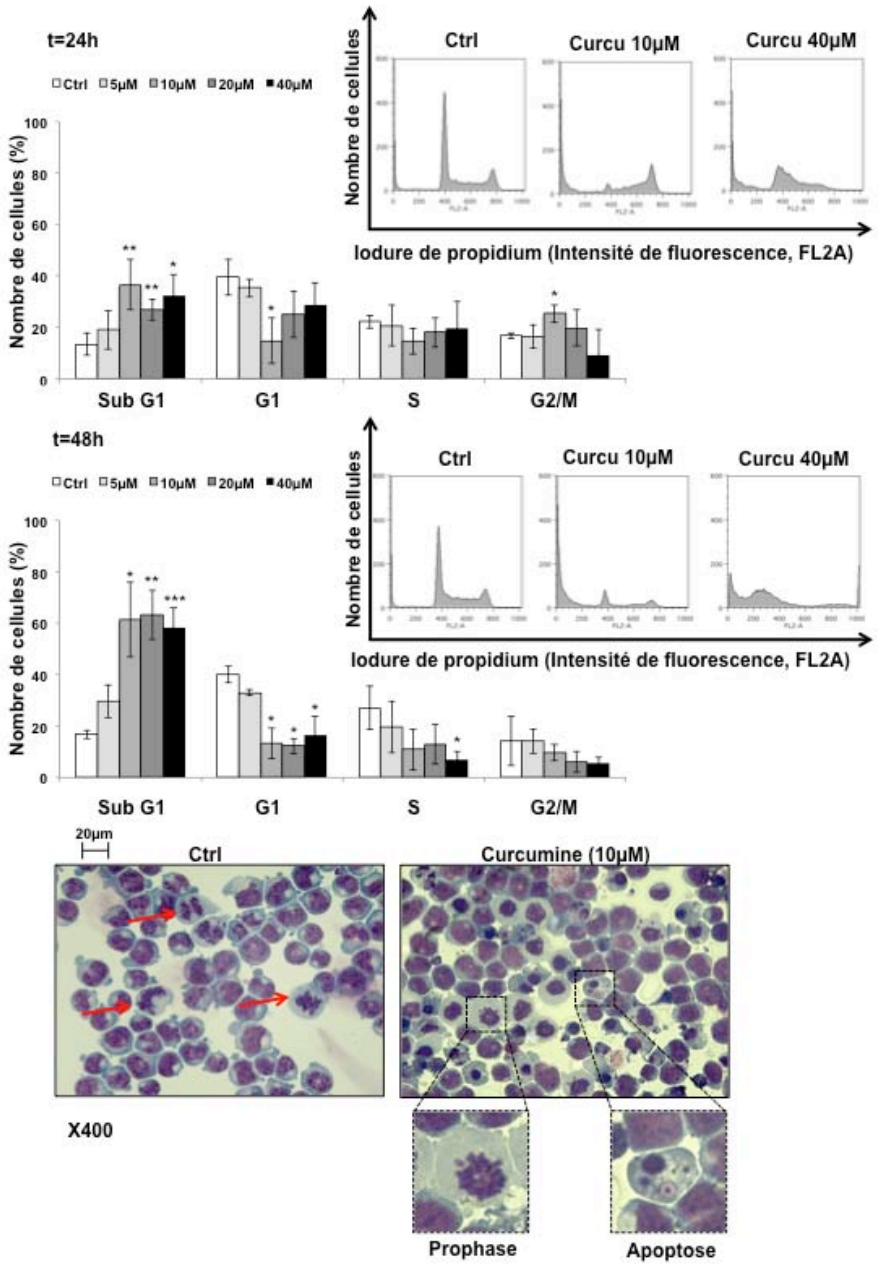


Figure 78 : Etude de l'effet de la curcumine sur le cycle cellulaire des cellules U937

Les cellules U937 ont été traitées par différentes concentrations de curcumine (5, 10, 20, 40µM) pendant 24h (**A**) et 48h (**B)**. Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium. Le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire (Sub G1, G0/G1, S et G2/M) a été quantifié à l'aide du logiciel FlowJo. L'index mitotique a été étudié à l'aide d'une coloration de May-Grünwald Giemsa (**C**). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : cellules non traitées ; curcu : curcumine. * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

4.5.2 Effet de la combinaison curcumine/célécoxib sur les cellules U937 et K562

Les résultats précédents nous ont montré que la curcumine et le célécoxib affectent le cycle cellulaire de façon différente. Nous avons émis l'hypothèse que la combinaison de ces deux molécules pourrait avoir des effets bénéfiques sur les cellules déjà sensibles à la curcumine mais aussi sur les cellules résistantes.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet de cette combinaison sur la prolifération des cellules U937 et K562. Les cellules ont été prétraitées par différentes concentrations de célécoxib (10, 20 et 40µM) durant 24h. Puis nous avons traité les cellules par la curcumine à 10µM, la concentration pour laquelle nous avons observé une accumulation en phase G2/M du cycle cellulaire (voir section 4.4.1). Nos résultats montrent comme précédemment que la prolifération des cellules U937 est diminuée par le célécoxib et la curcumine (Figure 79A). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les échantillons traités par la curcumine et ceux prétraités par le célécoxib, puis traités par la curcumine. Le prétraitement n'a donc pas d'effet sur la prolifération des cellules U937. Pour les cellules K562, la curcumine seule n'affecte pas la prolifération des cellules mais, par contre, la combinaison curcumine/célécoxib conduit à une diminution significative de la prolifération cellulaire (Figure 79B). Cet effet n'a été observé que pour 40µM de célécoxib.

Nous avons ensuite étudié l'effet de cette combinaison sur le cycle cellulaire des cellules U937 et K562. Comme précédemment, nous avons observé une accumulation des cellules U937 en phase G0/G1 avec le célécoxib et en phase G2/M avec la curcumine. Cependant, le prétraitement par le célécoxib inhibe l'accumulation en phase G2/M du cycle cellulaire induite par 10µM de curcumine (Figure 80 A). De même, l'analyse de l'index mitotique a mis en évidence une accumulation de cellules mitotiques avec la curcumine (10µM) (26 ± 4,58% de cellules en mitose), mais le prétraitement par le célécoxib prévient cet effet (5,3 ± 3,79) (Figure 80 B).

Précédemment, nous avons vu que la curcumine passe par ce blocage des cellules en phase S et G2/M pour induire l'apoptose des cellules U937. Une diminution de l'apoptose induite par la curcumine devrait alors être observée. Nous avons donc étudié l'effet sur l'apoptose par morphologie nucléaire (Figure 81 A). Comme attendu, nous avons observé une diminution du nombre de cellules apoptotiques (46,33 ± 4,04 % pour les échantillons traités avec 10µM de curcumine contre 18 ± 3% pour les cellules prétraitées par 40µM de célécoxib

puis traitées par 10µM de curcumine). L'effet est d'autant plus fort que la concentration est importante et a été confirmé par l'analyse du potentiel membranaire mitochondrial (Figure 81 B). Pour les cellules K562, une sensibilisation à l'apoptose induite par la curcumine a été observée pour 40µM de célécoxib.

Le célécoxib contrecarre le blocage du cycle cellulaire en phase S et G2/M induit par la curcumine. Cet effet conduit à une protection à l'apoptose induite par la curcumine. Les résultats concernant la combinaison célécoxib/curcumine ont été récapitulés dans la figure 82.

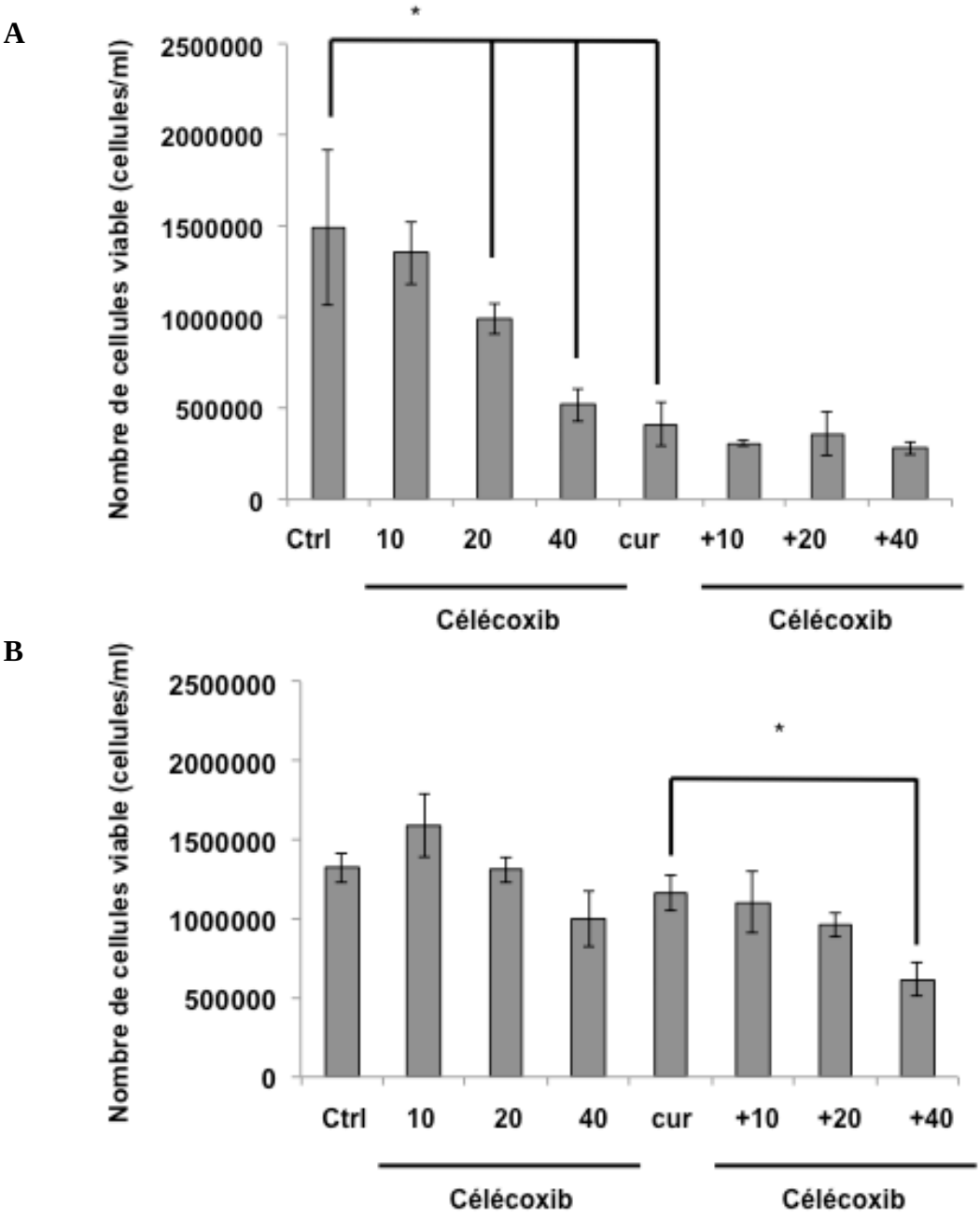


Figure 79 : Etude de l'effet de la combinaison célécoxib / curcumine sur la prolifération des cellules U937 et K562

Les cellules U937 (**A**) et K562 (**B**) ont été traitées pendant 48h par la curcumine (2-40 µM). La prolifération des cellules a été étudiée par coloration d'exclusion au bleu de trypan après 24h et 48h de traitement. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : cellules non traitées ; cur : curcumine. * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

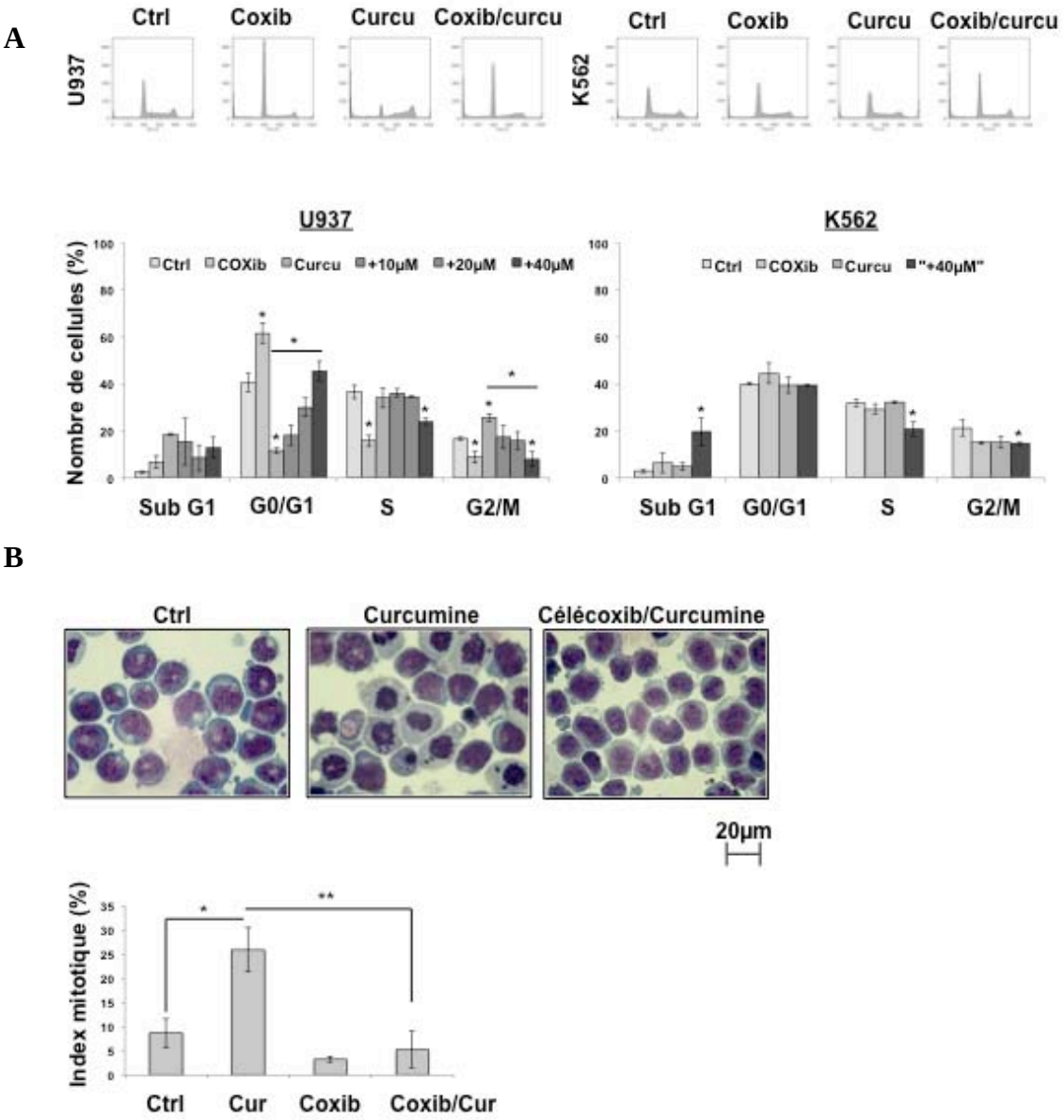
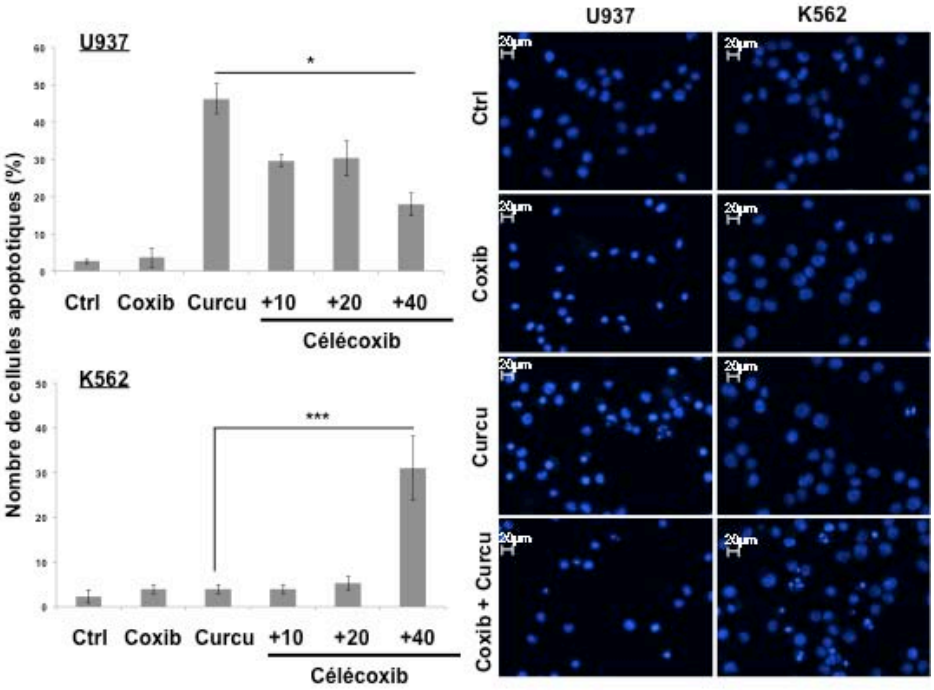


Figure 80 : Etude de l'effet d'un prétraitement de célécoxib sur l'accumulation en phase S et G2/M induite par la curcumine

Les cellules U937 et K562 ont été traitées par différentes concentrations de célécoxib pendant 24h, puis traitées par 10µM de curcumine pendant 24h. La distribution du cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium. Le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire (Sub G1, G0/G1, S et G2/M) a été quantifié à l'aide du logiciel FlowJo (**A**). L'index mitotique a été étudié à l'aide d'une coloration de May-Grünwald Giemsa (**B**). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : contrôle ; COXib : célécoxib 40µM Curcu : curcumine. * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

A



B

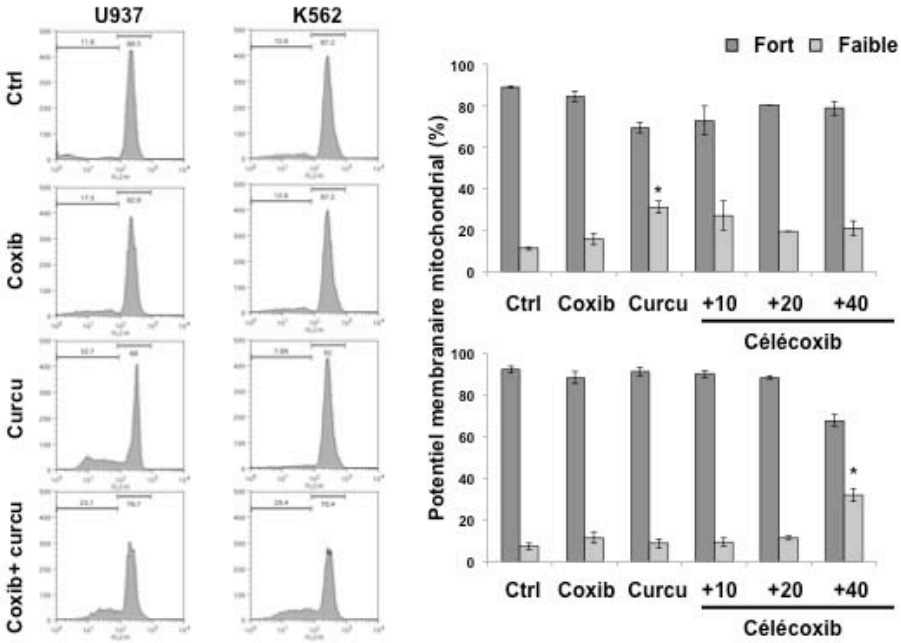


Figure 81 : Etude de l'effet d'un prétraitement de célécoxib sur l'apoptose des cellules U937 et K562 induite par la curcumine

Les cellules U937 et K562 ont été traitées par différentes concentrations de célécoxib, puis traitées par 10µM de curcumine. L'apoptose a été évaluée par morphologie nucléaire par microscopie à fluorescence à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342 (**A**) et par l'analyse du potentiel membranaire mitochondrial par cytométrie en flux (**B**). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : contrôle; Coxib : célécoxib 40µM Curcu : curcumine. * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

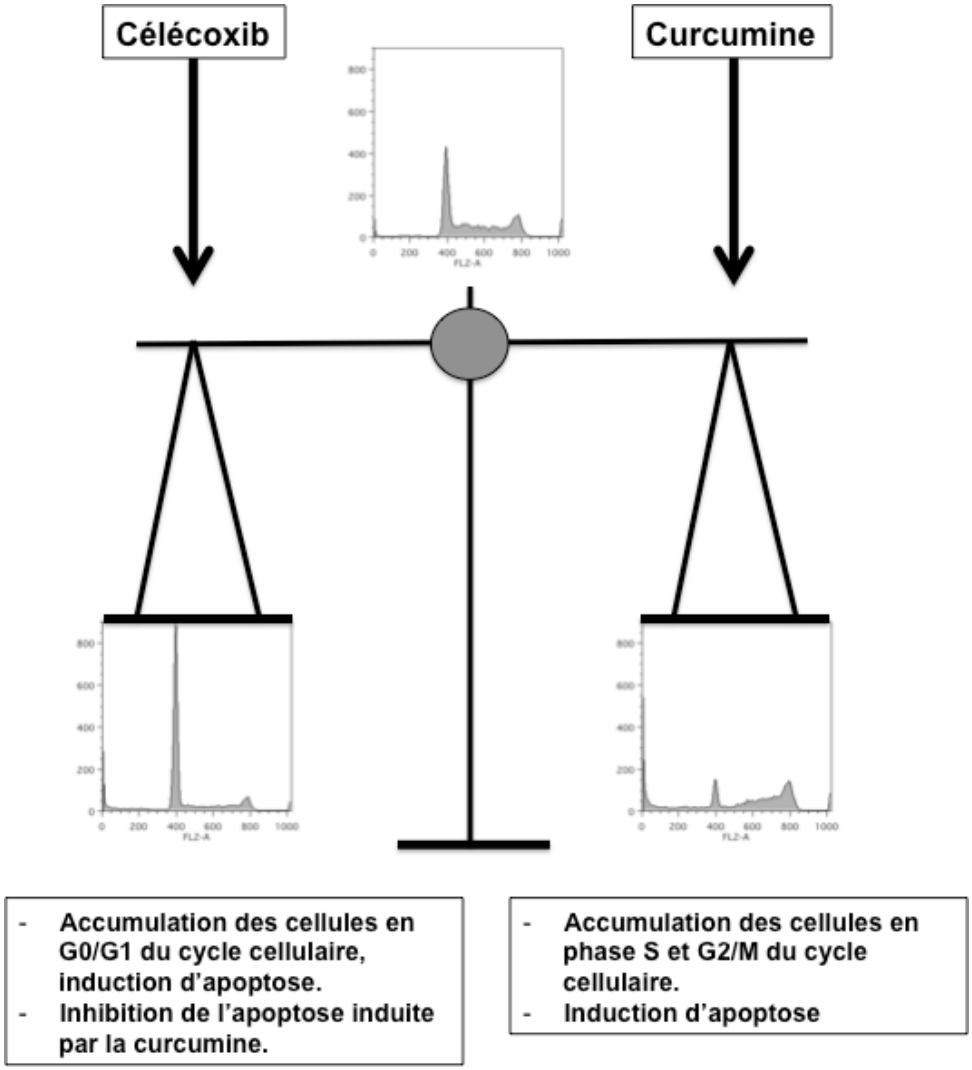


Figure 82 : Modèle d'action de la combinaison célécoxib / curcumine dans les cellules U937

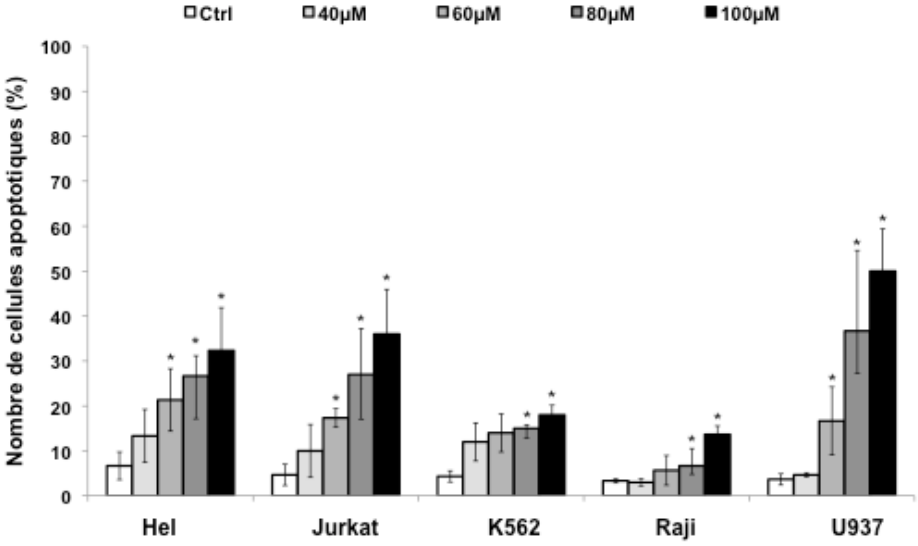
L'étude de la combinaison célécoxib / curcumine nous a permis d'observer que le célécoxib contrecarre l'effet apoptotique de la curcumine dans le cas d'un co-traitement ou d'un prétraitement avec le célécoxib. Cet effet est la conséquence d'une différence d'effet de ces deux composés sur la distribution du cycle cellulaire des cellules U937. La curcumine induit l'apoptose des cellules U937 en bloquant les cellules en phase S et G2/M. En présence de célécoxib, les cellules vont plutôt s'accumuler en phase G0/G1, diminuant ainsi le nombre de cellules en phase S et G2/M et donc l'apoptose de ces cellules induite pas la curcumine.

4.6 Effet du 2,5-diméthyl-célécoxib, un analogue du célécoxib, sur la prolifération et la survie de lignées cellulaires hématologiques.

Notre projet a permis de mettre en évidence un effet bénéfique du célécoxib, qui inhibe la prolifération des cellules tumorales et conduit à une diminution de l'expression de c-Myc. Notre étude a aussi suggéré que ces effets étaient indépendants de l'inhibition de COX-2. Les effets secondaires des inhibiteurs spécifiques de COX-2 sont la conséquence de l'inhibition de l'activité enzymatique de COX-2 (voir section 1.1.4.1). Par conséquent, il serait intéressant de séparer les effets bénéfiques des effets néfastes. Dans ce contexte, le DMC a été développé. Cette molécule possède une structure presque identique à celle du célécoxib, mais ne possède pas la capacité d'inhiber l'activité enzymatique de COX-2. Par ailleurs, cette molécule a démontré un effet antitumoral plus important que le célécoxib (Schonthal *et al.* 2008). Nous avons étudié l'effet de cette molécule sur la prolifération et l'apoptose des cellules U937 et K562.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer la dose de célécoxib nécessaire pour induire l'apoptose de nos différentes lignées cellulaires. Nous avons vu précédemment que le célécoxib n'induit pas l'apoptose des différentes lignées jusqu'à 40µM. Nous avons donc testé des concentrations supérieures à 40µM (60, 80 et 100µM) sur nos différentes lignées cellulaires. Après 8h de traitement, une induction d'apoptose a été observée dans toutes les lignées cellulaires. Les cellules U937 sont les cellules les plus sensibles à cet effet (jusqu'à 50 ± 9,42% de cellules en apoptose à 100µM) et les cellules K562 les plus résistantes (18 ± 2,16% de cellules en apoptose à 100µM). Cet effet a été confirmé pour la lignée U937 par l'étude du potentiel membranaire mitochondriale par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage au Mitotracker Red (Figure 83 B). Nous avons observé que le célécoxib induit une perte de ce potentiel, comme observé dans le contrôle positif (cellules U937 traitées à 100µM d'étoposide pendant 5h).

A



B

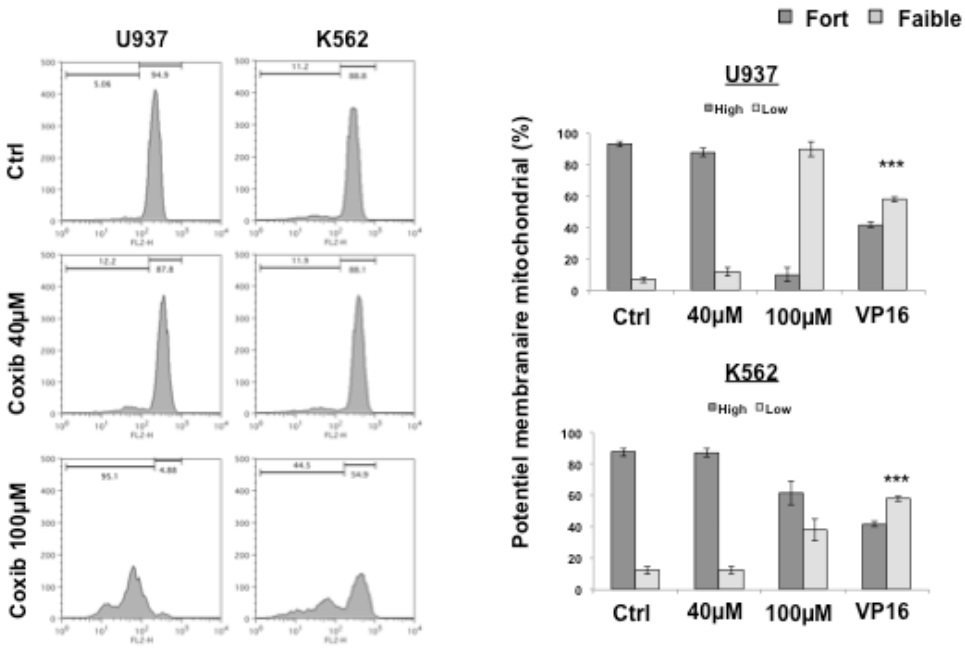


Figure 83: Effet du célécoxib sur l'apoptose des différentes lignées cellulaire leucémiques et lymphoblastiques.

Les cellules Hel, Jurkat, K562, Raji et U937 ont été traitées pendant 8h par différentes concentrations de célécoxib (40-100µM). Le pourcentage d'apoptose a été estimée par comptage des morphologies nucléaire (**A**). Ces résultats ont été confirmés pour les cellules U937 et K562 par l'étude du potentiel membranaire mitochondrial (**B**). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : contrôle ; Coxib : célécoxib. * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Pour l'étude du DMC, nous avons sélectionné la lignée la plus sensible au célécoxib (U937) et la lignée la plus résistante (K562). Les deux lignées ont donc été traitées par différentes concentrations de DMC (10, 20, 40, 60 et 100µM). L'apoptose a ensuite été analysée par morphologie nucléaire (Figure 84) après 8h de traitement. Une induction d'apoptose significative a ainsi été observée à partir de 40µM de DMC dans les cellules U937 et K562. Cette induction atteint 46 ± 5% avec 40µM dans les cellules U937 et 30 ± 8,72% dans les cellules K562. Ces données démontrent que le DMC possède un effet pro-apoptotique plus fort que le célécoxib.

Nous avons ensuite étudié l'effet du DMC sur la prolifération et l'apoptose des cellules U937 et K562 pour des temps de traitement plus long (24h et 48h), à des concentrations n'induisant pas l'apoptose après 8h de traitement. L'effet sur la prolifération cellulaire a été étudié à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de trypan. Les cellules ont été traitées pendant 48h à 10µM ou 20µM de DMC. Nous avons constaté que le DMC inhibe la prolifération des cellules U937 à 20µM après 24h de traitement (-49,28 ± 5,38%). L'effet n'est pas la conséquence d'une induction d'apoptose. Aucune modulation significative de la prolifération des cellules K562 n'a été observée. Après 48h, cet effet est encore plus important puisque le pourcentage d'inhibition de la prolifération des cellules U937 atteint 31,24 ± 8,32% à 10µM de DMC et s'élève à 77,27 ± 6,97% à 20µM. Pour 20µM, nous avons constaté une induction d'apoptose (31,75 ± 8,52%). La prolifération des cellules K562 est aussi inhibée après 48h avec 20µM de DMC (-48,07 ± 5,30%) mais n'est pas accompagnée d'une induction de mort cellulaire. La diminution de la prolifération est plus importante que celle observée précédemment avec le célécoxib (voir section 4.1) pour les cellules U937 et K562.

Le DMC a un effet pro-apoptotique plus important que le célécoxib et inhibe plus fortement la prolifération des cellules U937 et K562 que le célécoxib.

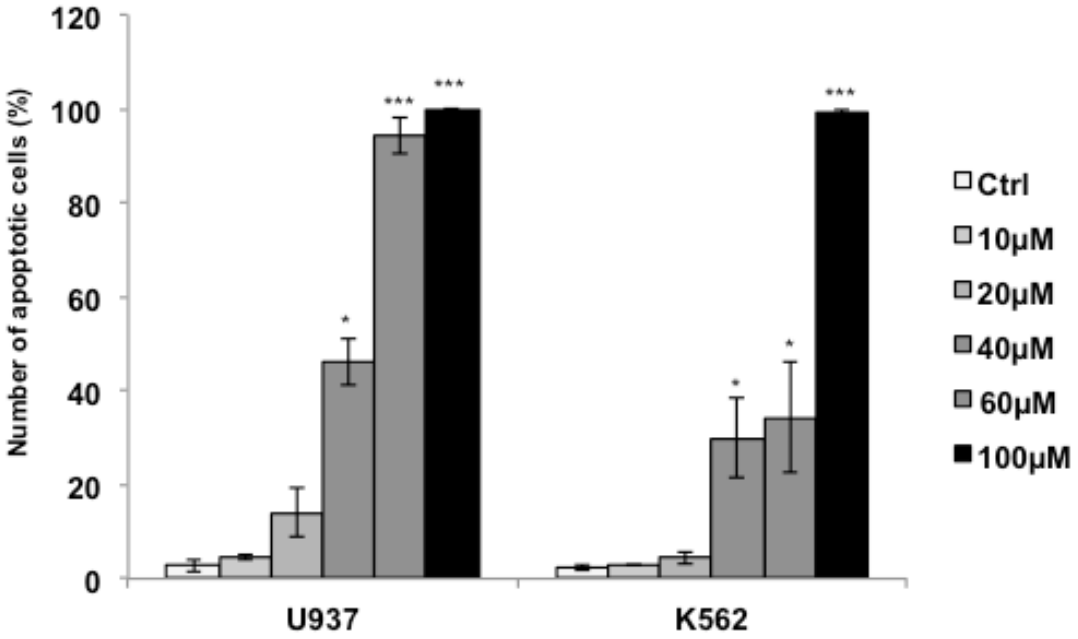
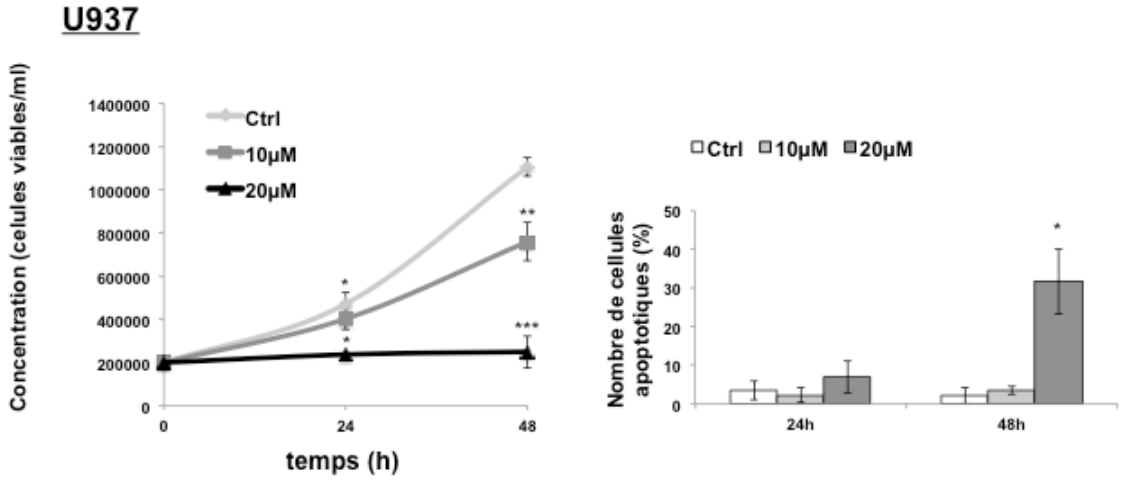


Figure 84: Effet du 2,5-diméthyl-célécoxib sur l'apoptose des différentes lignées cellulaires leucémiques et lymphoblastiques.

Les cellules U937 et K562 ont été traitées pendant 8h par différentes concentrations de DMC (10, 20, 40, 60, 100µM). Le pourcentage d'apoptose a été estimé par comptage des morphologies nucléaire à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences ± DS (déviation standard). Ctrl : contrôle ; Coxib : célécoxib. * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

A



B

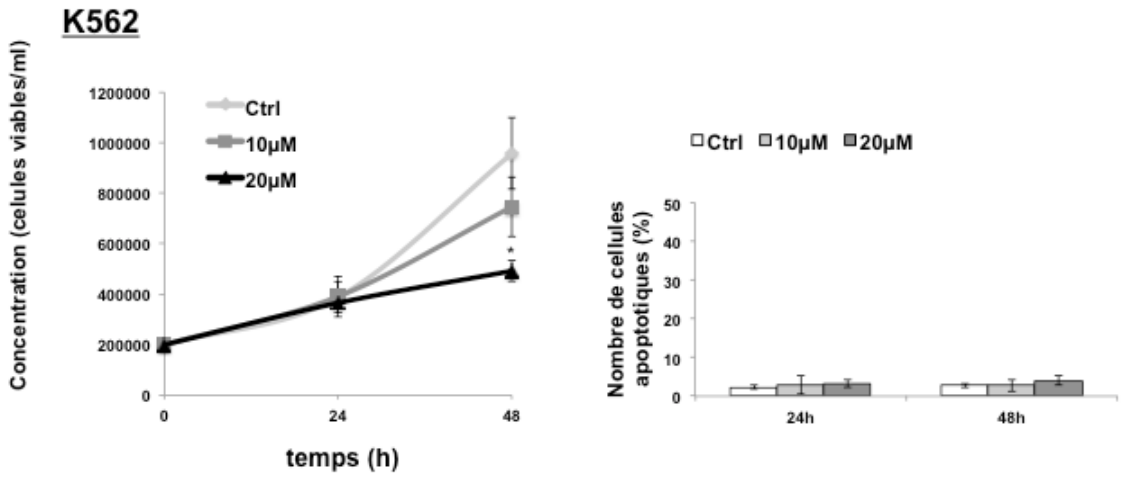


Figure 85 : Evaluation de l'effet de différentes concentrations en 2,5-diméthyl-célécoxib sur la prolifération et l'apoptose des lignées cellulaires U937 et K562.

Les cellules U937 (**A**) et K562 (**B**) ont été ensemencées à la concentration de 200000 cellules/mL lors de l'exposition à différentes concentrations en DMC (10, 20µM). Les comptages ont été effectués à l'aide d'une coloration d'exclusion au bleu de trypan et d'une cellule de Malassez après 24h et 48h de traitement. Le pourcentage d'apoptose a été estimé par comptage des morphologies nucléaires à l'aide d'un marquage au Hoechst 33342. Les résultats représentent la moyenne de cinq expériences ± DS (déviation standard). * : $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

.

5 Discussion

5.1 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération et le cycle cellulaire de lignées tumorales hématologiques

5.1.1 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération cellulaire

Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer l'effet de différents inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération cellulaire des différentes lignées cellulaires leucémiques et lymphoblastiques utilisées durant ce projet. Ainsi, nous avons étudié l'effet du nimésulide, du NS-398 et du célécoxib sur la prolifération des cellules Hel, Jurkat, K562, Raji et U937. Ces trois composés n'ont pas le même mécanisme d'action pour inhiber COX-2 (Copeland *et al.* 1994). Ces composés inhibent la prolifération de nos différentes lignées cellulaires. Les cellules U937 sont les cellules les plus sensibles aux inhibiteurs alors que les K562 sont peu affectées par les traitements. Par conséquent, afin de comprendre quels sont les mécanismes impliqués dans l'effet induit par les inhibiteurs de COX-2, nous avons focalisé majoritairement notre étude sur ces deux lignées cellulaires.

Des études ont déjà mis en évidence cet effet sur d'autres types cellulaires comme par exemple dans les cellules de cancers colorectaux (HCA-7 qui expriment COX-2 et les HCT-116 qui n'expriment pas cette protéine). Cette étude montre une inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée HCA-7 lors d'un traitement avec le SC-58125, un inhibiteur spécifique de COX-2 (Sheng, Shao et al. 1997). L'effet antiprolifératif du célécoxib a aussi été démontré sur la lignée U937 (Subhashini *et al.* 2005). Nous avons montré que cette diminution de la prolifération n'est pas due à l'induction d'apoptose par les trois inhibiteurs. Cependant, au delà de 40µM, le célécoxib induit l'apoptose de nos différentes lignées cellulaires. De nombreuses études réalisées sur le célécoxib dans la littérature ont déjà montré que ce composé est en mesure d'induire l'apoptose de plusieurs types cellulaires. De plus, il a été montré que cet effet peut se faire indépendamment de l'inhibition de l'activité de COX-2 (Jendrossek *et al.* 2003 ; Niederberger *et al.* 2006)**.** Nous avons, en effet, observé un effet pro-apoptotique sur les différentes lignées cellulaires utilisées, y compris les cellules K562 qui expriment très faiblement COX-2. Nos résultats sont en accord avec ces études. L'effet anti-

prolifératif des inhibiteurs de COX-2 n'étant pas dû à une induction d'apoptose, nous avons émis l'hypothèse que la progression du cycle cellulaire était perturbée.

5.1.2 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur le cycle cellulaire

Dans un deuxième temps, nous avons analysé la distribution des cellules dans le cycle cellulaire. Nous avons remarqué que l'inhibition de la prolifération cellulaire était associée à une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire et une diminution du nombre de cellules en phases S et G2. Cet effet a été observé avec le nimésulide, le NS-398 et le célécoxib, dans toutes les lignées cellulaires excepté la lignée K562. Des études ont déjà mis en évidence une accumulation des cellules U937 en phase G0/G1 avec le célécoxib (Subhashini, Mahipal et al. 2005) ainsi que dans d'autres modèles (Subhashini, Mahipal et al. 2005; Zhang, Liu et al. 2006). Le méloxicam, un autre AINS, a aussi montré cette capacité dans un modèle de carcinome hépatique où l'expression de PCNA et de la cycline A était diminuée (Li, Chen et al. 2006). Le NS-398 a démontré des effets similaires. Il a été par exemple démontré que le NS-398 diminue l'expression de la cycline D1 et de PCNA dans la lignée MC-26 (cancer colorectal exprimant constitutivement COX-2) (Yao, Lam et al. 2004), perturbant ainsi la transition G1/S. Des études sur des modèles hématologiques ont mis en évidence une accumulation en phase G0/G1 du cycle cellulaire avec des inhibiteurs de COX-2. C'est par exemple le cas du NS-398 qui augmente l'expression de p21. Les inhibiteurs de COX-2 semblent agir de manière similaire dans plusieurs modèles cellulaires, en perturbant la transition G1/S du cycle cellulaire.

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant le lien entre COX-2 et les mécanismes impliqués dans le déroulement du cycle cellulaire. Les études réalisées pour comprendre le mécanisme d'inhibition de la prolifération cellulaire par les inhibiteurs de COX-2 expliquent comment le cycle cellulaire est initié par des oncogènes. La transcription de ces oncogènes dépend de voies de signalisation induite par les prostaglandines qui agissent de manière autocrine ou paracrine (Breyer, Bagdassarian et al. 2001). Ces voies de signalisation passent par des récepteurs de la famille « EP », mais certaines études suggèrent aussi un rôle important des récepteurs nucléaires « PPAR » (peroxisome proliferator-activated receptor) (Cao and Prescott 2002). Plusieurs études ont reporté la présence de ces récepteurs « EP » sur des lignées leucémiques. C'est le cas de la lignée Hel par exemple qui exprime le récepteur EP3 (Paul *et al.* 1998). La lignée U937 aussi exprime les récepteurs EP2 et EP3 (Zeng *et al.* 1995).

Afin de mieux comprendre pourquoi les cellules sont bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire, nous avons évalué l'expression de plusieurs acteurs impliqués dans la transition G1/S. L'expression de l'ARNm de la cycline D1 a été analysée. Il s'agit d'une protéine chaperonne qui active les kinases Cdk4 et Cdk6 permettant ainsi la phosphorylation de Rb et la libération consécutive du facteur de transcription E2F qui régule l'expression des protéines importantes pour la phase S du cycle cellulaire comme PCNA par exemple (Kelman 1997). Nous avons remarqué que le nimésulide diminue l'expression de la cycline D1 après 24h et 48h de traitement dans les cellules U937. Par ailleurs, l'expression de PCNA a aussi été analysée par PCR en temps réel et les résultats montrent une diminution de son expression après 48h de traitement avec le nimésulide, le NS-398 et le célécoxib. Ces résultats ont été confirmés par Western Blot. La diminution de la cycline D1 et de PCNA n'a pas été observée pour les cellules K562. Une diminution de la phosphorylation ou du niveau d'expression de Rb pourrait expliquer ces résultats.. La phosphorylation de Rb est inhibée par des protéines qui inhibent les Cdks. Ces protéines appartiennent à deux familles qui sont la famille Cip/Kip, réunissant les protéines p21, p27, p57 et la famille INK4 qui contient les protéines p15, p16, p18, p19 (Stewart, Westfall et al. 2003). Nous avons constaté que l'expression de l'ARNm et de la protéine p27 est augmentée dans la lignée cellulaire U937 après traitement avec le nimésulide, le NS-398 ou le célécoxib. Ces résultats ont été confirmés par Western Blot après 24h et 48h de traitement par le nimésulide. p27 est une protéine qui peut jouer un double rôle comme montré dans une étude de Larrea *et al* puisque la forme phosphorylée de p27 (sur les résidus T157, S10, T198 et Y74) stabilise les complexes Cdk4/cyclineD1 et Cdk6/cycline D1 et favorise leur translocation vers le noyau alors que la forme non phosphorylée conduit à une inhibition de la transition G1/S (Larrea *et al.* 2008). Dans notre modèle, les inhibiteurs de COX-2 pourraient induire une diminution de la phosphorylation de p27.

Nous avons aussi étudié l'expression de l'ARNm de p18, p19 et p21 par PCR en temps réel et nous avons observé une augmentation de l'expression de ces facteurs dans la lignée U937 et dans les cellules K562. Nous nous sommes concentrés sur les acteurs exprimés de façon différente entre les cellules U937 et K562.

5.1.3 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de c-Myc

Nos résultats sont en accord avec la diminution de la prolifération cellulaire et l'accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. L'expression de la cycline D1 est sous la dépendance d'oncogènes comme c-Myc ou le complexe AP-1 (c-Jun/c-Fos) qui contrôle le passage des cellules de G0 vers G1. Par ailleurs, c-Myc est aussi un répresseur de la transcription de p27 (Yang, Shen et al. 2001). Nos résultats, en accord avec les données bibliographiques, nous ont poussés à analyser l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur le niveau d'expression de c-Myc dans nos cellules. Notre étude nous a alors montré que les inhibiteurs de COX-2 diminuent l'expression de c-Myc dès 1h de traitement dans les cellules U937. Une diminution de l'expression de c-Myc a aussi été observée dans les lignée Hel, Jurkat et Raji après 24h de traitement mais pas dans la lignée K562.

c-Myc est une protéine qui peut être régulée par dégradation *via* le protéasome 26S (Kitagawa *et al.* 2009). Cependant, nos résultats ont exclu un effet sur la stabilité de c-Myc.

Ensuite, nous avons étudié l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression et la stabilité de l'ARNm de c-Myc. Nous avons mis en évidence un effet différent entre 1h et 24h de traitement. Pour 1h de traitement, le niveau d'ARNm de c-Myc diminue alors que pour 24h de traitement, ce niveau augmente. L'étude de la stabilité de l'ARNm n'a révélé aucune modulation par les inhibiteurs de COX-2. Nos résultats ont permis de conclure à une diminution de la transcription pour des temps de traitement court (1h) et une diminution de la traduction de la protéine pour des temps de traitement plus long (24h). Cependant, nous n'excluons pas l'hypothèse d'un effet sur la traduction de c-Myc pour les temps de traitement courts, qui accompagnerait la diminution de la transcription. La transcription de c-Myc est sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation activées notamment pendant le développement et dans les cancers. Ce sont par exemple les voies Wnt/β-cat, TGF-β ainsi que les MAPKs. Certaines de ces voies sont activées par COX-2 et plus particulièrement par les prostaglandines issues du métabolisme de l'AA par cette enzyme, *via* des récepteurs membranaires (récepteurs EP) (Breyer, Bagdassarian et al. 2001). La PGE2 est par exemple capable de se fixer sur les récepteurs EP2 et EP4, des récepteurs membranaires à protéine G, ce qui peut activer l'adénylate cyclase. L'augmentation d'AMPc qui en résulte peut activer plusieurs kinases comme par exemple les MAPKs, qui à leur tour contrôlent la transcription de c-Myc. Nos résultats ont démontré que l'inhibition de ERK1/2 par un inhibiteur spécifique

(PD98059) conduit à une diminution de l'expression de c-Myc et que le nimésulide diminue la phosphorylation de ERK1/2. Ces résultats suggèrent que la diminution de la transcription de c-Myc par les inhibiteurs de COX-2 passe par une diminution de l'activation de ERK1/2. Cependant, les autres voies de signalisation citées précédemment pourraient aussi être impliquées.

Concernant la régulation de la traduction de c-Myc, plusieurs voies pourraient être impliquées. En effet, l'ARNm de c-Myc contient une région 3'NT qui est la cible de plusieurs protéines contrôlant la stabilité, ou la traduction de l'ARNm (Audic and Hartley 2004). Parmi ces protéines, des AUBP comme par exemple TIA-1 et TIAR qui peuvent inhiber la traduction de c-Myc (Mazan-Mamczarz, Lal et al. 2006 ; Liao, Hu et al. 2007).

Par ailleurs, l'ARNm de c-Myc peut être la cible de petits ARN non codants, comme par exemple les miRs. Ces petits ARNs (environ 22 nucléotides) sont capables de se fixer de manière complémentaire sur l'ARNm cible, ce qui conduit à sa dégradation *via* le système Dicer ou, si la complémentarité n'est pas parfaite, à une diminution de la traduction de l'ARNm cible (Mello and Conte 2004). C'est notamment le cas de miR34a comme montré dans une étude sur des fibroblastes (lignée cellulaire TIG3) (Christoffersen, Shalgi et al.). Grâce à l'algorithme « Target Scan », nous avons sélectionné les miRs potentiels régulant l'expression de c-Myc, puis nous avons choisi ceux qui ont déjà démontré un effet sur la traduction de c-Myc. Notre étude nous a donc conduis à analyser l'expression de miR-34a, et des miRs de la famille Let-7. Nos résultats ont permis de montrer que le nimésulide et le célécoxib augmentent significativement l'expression des miRs Let-7c et Let-7f. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la traduction de c-Myc passe par ces deux candidats.

Il est important de préciser que c-Myc est un répresseur transcriptionnel de plusieurs miRs jouant un rôle dans la prolifération cellulaire. C'est par exemple le cas de miR23a et miR23b qui inhibe l'expression de la glutaminase mitochondriale (Gao *et al.* 2009). La perturbation du métabolisme de la glutamine qui en résulte est responsable d'une diminution de la prolifération cellulaire et d'une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. La diminution de la prolifération par les inhibiteurs de COX-2 pourrait donc passer par ce mécanisme.

5.1.4 Evaluation de l'implication de COX-2 dans les différentes lignées cellulaires

Les données bibliographiques ont démontré que les inhibiteurs de COX-2 peuvent induire leurs effets, indépendamment de l'inhibition de l'enzyme. Afin de clarifier cet aspect, nous avons dans un premier temps étudié l'expression de COX-1 et de COX-2 au niveau de l'ARNm et au niveau protéique par PCR en temps réel et par Western Blot dans les différentes lignées cellulaires utilisées. En accord avec les données de la littérature, nous avons observé une expression constitutive de COX-1 dans les différentes lignées cellulaires utilisées. Pour COX-2, nous avons pu observer que cette protéine est exprimée dans toutes les lignées cellulaires. L'expression est forte dans les cellules Hel, Jurkat, Raji et U937 mais est très faible dans la lignée K562. L'expression de COX-2 est inductible et est régulée par des cytokines pro-inflammatoires comme l'Il-6, le TNFα, l'Il-1β mais aussi des facteurs de croissance comme l'EGF par exemple (Tsatsanis, Androulidaki et al. 2006)**.** Le fait que COX-2 soit constitutivement exprimé dans les autres lignées cellulaires suggère une perturbation d'une/des voie(s) de signalisation intracellulaires régulatrices de l'expression de COX-2 ou dans le gène de COX-2 même. Par ailleurs, des perturbations épigénétiques peuvent aussi être responsables de la surexpression de la protéine, ou encore des modifications post-transcriptionnelles contrôlant la stabilité de l'ARNm (Cerella, Sobolewski et al. 2010). Des mutations de Ras, impliquées dans la voie des MAPKs et régulant l'expression de COX-2 ont déjà été corrélées avec une surexpression de COX-2 comme montré dans une étude sur des cellules de cancer du poumon à petites cellules (Bos 1989). La mutation de Ras est aussi responsable d'une surexpression de COX-2 dans le cas de myélomes ainsi que dans d'autres types de cancers comme le cancer du sein par exemple où l'expression de COX-2 est corrélée à une plus forte agressivité tumorale (Gilhooly *et al.* 1999). Dans le cancer du côlon, la mutation d'APC conduit à une expression constitutive de COX-2 (Eisinger *et al.* 2006).

Le lien entre l'inflammation chronique et la progression tumorale est connu et implique COX-2 (Coussens and Werb 2002). Dans plusieurs types de cancers, la surexpression de COX-2 est responsable d'une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses et une perte de sensibilité aux signaux apoptotiques. Ce lien est particulièrement connu pour les tumeurs solides mais les mécanismes impliqués dans les cancers hématologiques ne sont pas clairement définis. Dans notre étude, nous avons observé un effet

anti-prolifératif induit par les inhibiteurs de COX-2. Parmi les lignées cellulaires étudiées, les cellules U937 apparaissent plus sensibles que les autres lignées. A l'inverse, les cellules K562 sont plus résistantes. La différence de sensibilité présente une bonne corrélation avec les niveaux d'expression de COX-2. p53 et p73 sont aussi des régulateurs de la progression du cycle cellulaire en phase G1/S (Agarwal, Agarwal et al. 1995). Cependant, notre analyse de l'expression de p53 et p73 n'a pas révélé de corrélation comme pour COX-2. Ces résultats suggèrent donc un effet dépendant de l'expression de COX-2.

COX-2 est une enzyme qui participe au métabolisme de l'AA et conduit, en association avec les isomérases présentes dans les cellules à la formation de prostaglandines. Parmi les prostaglandines, la PGE2 a retenu notre attention. En effet, les PGE2 sont fortement synthétisées dans plusieurs types de tumeurs et régulent positivement la prolifération des cellules tumorales, notamment en favorisant la transition G1/S (Doherty, Byrne et al. 2009). Il a par ailleurs été démontré que les PGE2, *via* les récepteurs EP2/EP4, transactivent le récepteur de l'EGF et induit de ce fait la voie des MAPKs qui contrôle l'expression et la phosphorylation d'oncogènes comme c-Myc, c-fos, c-jun (Dunn *et al.* 2005; Al-Salihi *et al.* 2007). Dans notre étude, nous avons émis l'hypothèse que si la diminution de l'expression de c-Myc, induite par les inhibiteurs de COX-2 est bien la conséquence d'une diminution de l'activité enzymatique de COX-2 alors, il est possible que les PGE2 ont un rôle important dans cet effet. Par conséquent, l'administration de PGE2 pourrait prévenir l'effet des inhibiteurs de COX-2. Cependant, nos résultats n'ont pas été dans ce sens. Malgré le traitement des cellules U937 avec des PGE2, le nimésulide a conservé sa capacité à inhiber l'expression de c-Myc. Nos résultats suggèrent donc que malgré une bonne corrélation entre l'expression de COX-2 dans les différentes lignées cellulaires et la sensibilité de ces cellules aux inhibiteurs de COX-2, cet effet est indépendant de la synthèse de PGE2. Notre étude a ensuite démontré que les cellules U937 produisent une quantité de PGE2 proche de celle des cellules K562. De plus, les inhibiteurs de COX-2 ne diminuent pas la synthèse de PGE2 dans les cellules U937. Ces résultats nous ont donc suggéré que l'enzyme est peu active dans ces cellules et renforcent l'idée d'un effet indépendant de COX-2.

5.1.5 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression de marqueurs de différenciation myéloïdes

L'inhibition de la prolifération cellulaire avec l'accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire peut être la conséquence d'une différenciation cellulaire (Abelev 2000). Les cellules U937 possèdent la capacité de se différencier en monocytes ou en granulocytes. Les cellules Hel possèdent la capacité de se différencier en mégacaryocytes (Hassan and Freund 1995) et les cellules K562 peuvent se différencier en érythrocytes ou en mégacaryocytes (Tani *et al.* 1996). L'expression de marqueurs de surface associée à ces différentes différenciations a alors été analysée dans les cellules U937, Hel et K562 traitées par les inhibiteurs de COX-2. Notre étude a alors montré que les inhibiteurs de COX-2 conduisent à une augmentation de l'expression de CD15 (marqueur granulocytaire) dans les cellules U937. La différenciation des cellules U937 en monocytes est fréquemment associée à une augmentation des marqueurs CD11b et CD14. Cependant, aucune augmentation de ces marqueurs n'a été observée dans les cellules U937. Une augmentation de l'expression des marqueurs mégacaryocytaires CD41a et CD61 a été observée dans les cellules Hel. Aucune modulations des marqueurs CD41a et CD61 n'a été observée avec les cellules K562, ce qui est corrélé à la faible sensibilité de ces cellules aux inhibiteurs de COX-2 et à l'absence d'accumulation en phase G0/G1 du cycle cellulaire. La différenciation cellulaire s'accompagne d'une accumulation des cellules en phase G0 du cycle cellulaire. Cet effet est la conséquence d'une entrée des cellules en quiescence. L'analyse de l'expression de la protéine Ki-67 nous a confirmé qu'une partie des cellules U937 entrent en phase G0 du cycle cellulaire. Nous avons par ailleurs vérifié si cette entrée en G0 est la conséquence d'une induction de sénescence. La sénescence, contrairement à la quiescence est irréversible et est caractérisée par une augmentation de la taille et de la granulosité des cellules (cellules géantes), une accumulation de vacuoles dans le cytoplasme, la présence de SAHF à cause d'une méthylation de l'histone H3 (te Poele, Okorokov et al. 2002) et une augmentation de l'activité β-galactosidase due à l'augmentation de la masse lysosomiale (Dimri, Lee et al. 1995). Nous avons exclu cette hypothèse par l'étude de l'activité β-galactosidase. Notre étude a révélé la présence de vésicules présentant une activité β-gal. Cependant le profil de cette activité ne correspond pas à celui de cellules sénescentes comme observé dans notre contrôle positif.

Dans notre étude, nous avons montré que le nimésulide inhibe la phosphorylation de ERK1/2. Une autre étude a montré un lien entre ERK1/2 et la différenciation granulocytaire dans les cellules U937. Ce lien met en jeu le facteur de transcription C/EBPα (CCAAT/enhancer binding protein α). La phosphorylation de C/EBPα par ERK1/2 sur la sérine 21 conduit à son inactivation (Ross *et al.* 2004). C/EBPα contrôle la différenciation granulocytaire en permettant par exemple l'expression de marqueurs spécifiques comme par exemple CD15 (Nakayama, Nishihara et al. 2001). Par ailleurs, il a été montré que C/EBPα inhibe la transcription de c-Myc (Johansen *et al.* 2001; Hoffman, Amanullah et al. 2002). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que la différenciation cellulaire s'accompagne souvent d'une diminution de l'expression de c-Myc (Abelev 2000 ; Dimberg and Oberg 2003). Nous suggérons par conséquent que C/EBPα pourrait être l'un des facteurs clés dans l'effet médié par les inhibiteurs de COX-2.

Les inhibiteurs de COX-2 semblent induire une différenciation cellulaire pour les cellules U937 et Hel. Cependant, même si les inhibiteurs de COX-2 permettent une augmentation de l'expression de marqueurs myéloïdes, ces molécules ne permettent pas d'aboutir à une différenciation complète. En effet, la coloration de May-Grünwald Giemsa n'a pas révélé les modifications morphologiques attendues pour une différenciation granulocytaire des cellules U937, même après six jours de traitement (données non montrées). Ces résultats suggèrent donc que les inhibiteurs de COX-2 poussent les cellules vers un état de différenciation plus avancé sans atteindre un stade de différenciation terminal.

Ces dernières années, la capacité des cellules tumorales à entrer en dormance tumorale a été étudiée. La dormance est notamment caractérisée par une quiescence cellulaire, avec une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, une diminution de l'expression de c-Myc et un état de différenciation plus avancée. Cet état peut s'interrompre plusieurs années après un succès thérapeutique et peut donc conduire à une rechute (Almog 2010). Il a aussi été montré que la réactivation de c-Myc peut à elle seule conduire à un phénotype tumoral (Klapproth *et al.* ; Hoffman, Amanullah et al. 2002 ; Prochownik 2004). Par conséquent, l'une des stratégies pour empêcher ces rechutes pourrait consister en le maintien de ces cellules tumorales en état de dormance. Nos travaux ont montré des similarités entre les effets induits par les inhibiteurs de COX-2 et la dormance tumorale comme par exemple l'accumulation en phase G0/G1 du cycle cellulaire, la diminution de l'expression de c-Myc et un état plus différencié. Il serait donc intéressant d'étudier le lien possible entre l'effet des inhibiteurs de COX-2 et la dormance tumorale.

Par ailleurs, il serait intéressant de savoir si les inhibiteurs de COX-2 peuvent aussi diminuer l'expression d'autres membres de la famille Myc, comme par exemple N-Myc, qui est fréquemment surexprimé dans les tumeurs du cerveau chez l'enfant (Gualdrini, Corvetta et al. 2010; Buechner, Tomte et al. 2011). Par ailleurs, la dérégulation de la différenciation myéloïde est fréquemment associée aux leucémies myéloïdes aigues. L'utilisation d'agents capables de différencier les cellules leucémiques comme par exemple l'acide rétinoïque ou encore des agonistes du récepteur nucléaire RXR (*par exemple,* le bexarotène) (Tsai *et al.* 2007) ou encore l'acide valproique ont montré une diminution de l'agressivité de ces cellules cancéreuses. D'une manière similaire, la 1,25-dihydroxyvitamine D3 induit la différenciation de cellules leucémiques. Cependant, l'utilisation de cette molécule en clinique est limitée par ses effets secondaires, comme l'hypercalcémie qui peut conduire à des infarctus (Jamshidi, Zhang et al. 2008). L'une des stratégies récemment proposée pour résoudre ce problème serait de combiner de faible dose de 1,25D avec d'autres molécules qui pourraient potentialiser son effet. Dans ce contexte, les AINS (indométacine) et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (DUP-697) ont démontré qu'ils pouvaient potentialiser la différenciation induite par le 1,25D. Dans cette étude, cet effet était associé à une augmentation de la phosphorylation de Raf1 et une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules HL-60 et U937. De plus, dans une autre étude, la diminution de l'expression de l'oncogène Cot1, associée à une diminution de sa cible, ERK5, sensibilise des cellules à la différenciation induite par le 1,25D (Wang *et al.* 2010).

Nos travaux montrent un effet bénéfique des inhibiteurs de COX-2 qui inhibent la prolifération cellulaire et induisent une diminution rapide de l'expression de c-Myc. Nous avons également montré que les inhibiteurs de COX-2 conduisent à un état de différenciation plus avancé dans les cellules Hel et U937. Nos résultats suggèrent donc que les inhibiteurs de COX-2 pourraient avoir un effet bénéfique dans les thérapies visant à différencier les cellules tumorales.
Les résultats de cette partie de l'étude sont résumés dans la figure 86.

.

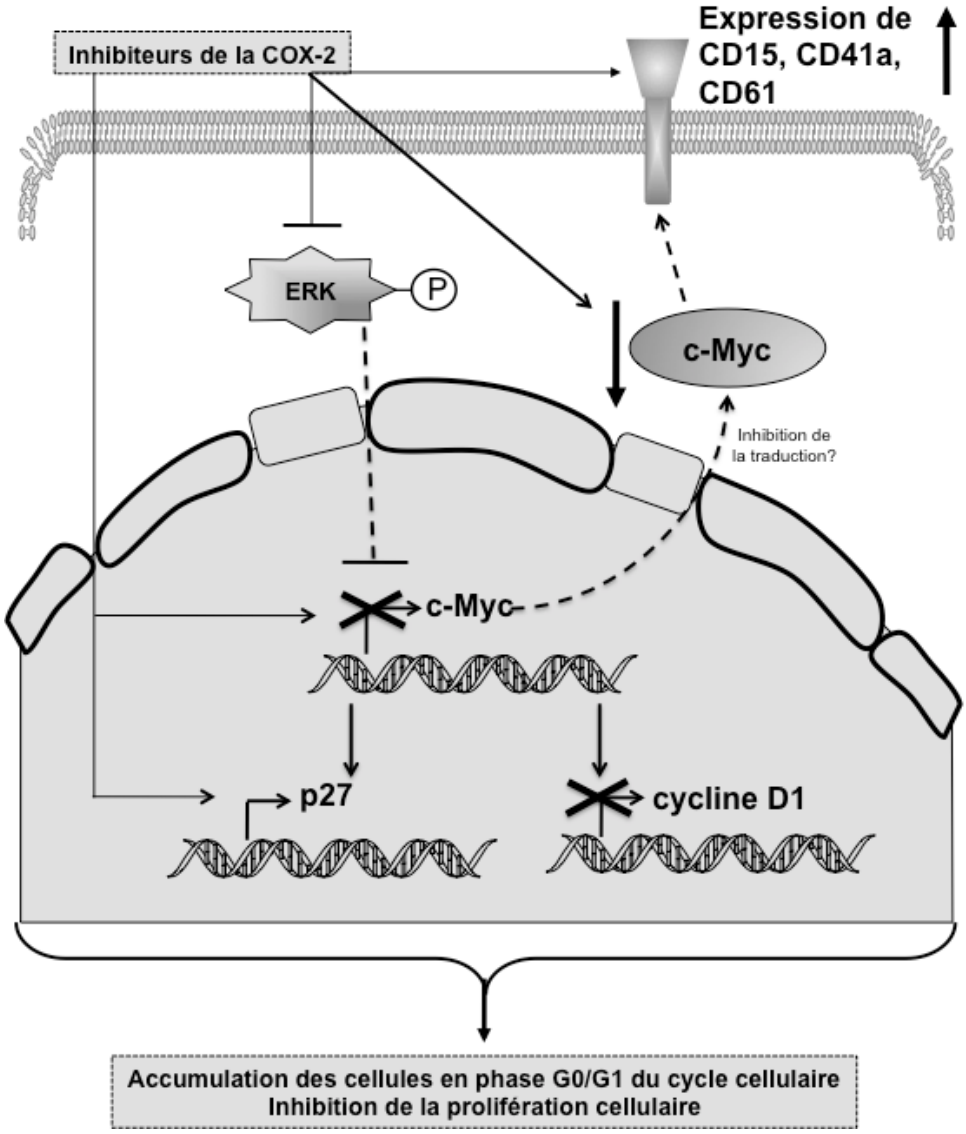


Figure 86 : Action des inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses hématopoïétiques : un modèle

Les inhibiteurs de COX-2 conduisent à une diminution rapide de l'expression de c-Myc qui s'accompagne d'une diminution de l'expression de la cycline D1 ainsi que d'une augmentation de l'expression de p27. Ces modulations ont pour conséquence une inhibition de la transition G1/S du cycle cellulaire et une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. L'accumulation est accompagnée par une augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation comme CD15, CD41a, CD61. Par ailleurs, Les inhibiteurs de COX-2 inhibent la phosphorylation de ERK1/2, ce qui pourrait être responsable de la diminution de l'expression de c-Myc.

5.2 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose des lignées cellulaires hématologiques

5.2.1 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose intrinsèque

Les inhibiteurs de COX-2 ont démontré un effet anti-prolifératif dans nos différents modèles cellulaires. D'après la littérature, ces inhibiteurs peuvent aussi potentialiser l'effet des agents chimiothérapeutiques dans plusieurs types cellulaires (Sobolewski, Cerella et al. 2010). Cependant, peu d'études dans les modèles hématologiques ont été réalisées. Nous avons étudié l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques.

Dans un premier temps, nous avons constaté que les cellules U937 traitées par des inhibiteurs de COX-2 (nimésulide, NS-398 et célécoxib) deviennent plus résistantes à l'apoptose induite par l'étoposide. Aux concentrations maximales en NS-398 et nimésulide, nous avons observé un blocage total de l'apoptose induite par l'étoposide.

Le même effet chimioprotecteur a pu être observé pour d'autres agents inducteurs de l'apoptose intrinsèque comme la camptothécine, l'irinotécan, la doxorubicine, le cisplatine, le méthotrexate et la cytarabine. Les résultats suggèrent que l'effet n'est pas caractéristique de l'apoptose induite par l'étoposide mais de l'apoptose induite par plusieurs agents chimiothérapeutiques.

Notre étude a montré que cet effet pouvait aussi se produire dans d'autres types cellulaires, puisque nous avons aussi observé une résistance à l'apoptose induite par le cisplatine dans les cellules Hel, Jurkat, K562 et Raji. Par ailleurs, nos résultats renforcent l'idée que les inhibiteurs de COX-2 agissent indépendamment de l'inhibition de COX-2 puisque la lignée K562 qui exprime faiblement COX-2 par rapport aux autres lignées cellulaires devient aussi résistante après traitement avec le célécoxib. De plus, le DMC, un analogue du célécoxib ne possédant pas la capacité d'inhiber COX-2 (Kardosh, Wang et al. 2005), conduit à un effet similaire avec le célécoxib dans les cellules U937.

Afin de comprendre à quel niveau l'apoptose est affectée, nous avons étudié les différentes étapes de l'apoptose intrinsèque. Nous avons ainsi montré que la protection est caractérisée par une inhibition du clivage de la caspase-8 et de la caspase-9**.** Nos résultats ont démontré que cet effet n'est pas lié à un effet sur l'expression de XIAP, une protéine qui inhibe l'activité de ces caspases.

Nous avons ensuite étudié l'effet du nimésulide sur le potentiel membranaire mitochondrial et nous avons remarqué que cet inhibiteur inhibe la perte du potentiel mitochondrial induite par l'étoposide. Nous avons ensuite constaté une inhibition de la libération de cytochrome c qui explique alors l'inhibition du clivage des caspases-3, -8 et -9. En effet, le cytochrome c permet la formation de l'apoptosome, un complexe protéique conduisant à l'activation protéolytique de la caspase-3 (Coppola and Ghibelli 2000). En amont de la mitochondrie, le nimésulide et le NS-398 inhibent l'activation de la protéine Bax lors de l'apoptose induite par l'étoposide. Durant le processus apoptotique, Bax est transloqué au niveau de la mitochondrie pour permettre la libération de facteur comme le cytochrome c. Cet effet s'accompagne d'une dégradation de Bcl-2 par le protéasome (Dimmeler, Breitschopf et al. 1999; Burlacu 2003). Ces résultats nous ont poussé à étudier l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL, des protéines qui inhibent l'activité de Bax. Nous avons remarqué que l'expression de ces protéines n'est pas affectée par le traitement avec les inhibiteurs de COX-2 seuls.

La plupart des données dans la littérature suggèrent que les inhibiteurs de COX-2 conduisent à une chimio-sensibilisation à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques pour différents types cellulaires. En effet, il a été démontré que la combinaison du NS-398 et du chlorambucil, un agent alkylant, permet d'augmenter l'apoptose des cellules LLC-B (Leucémie lymphoïde chronique à lymphocytes B) provenant de patients (Secchiero, Barbarotto et al. 2005). Le NS-398 est aussi capable d'augmenter l'effet cytotoxique de la gemcitabine, un antimétabolite analogue de la 2'-déoxycytidine, sur les cellules A549ACA (lignée d'adénocarcinome du poumon) en augmentant l'apoptose (Chen, Xiao et al. 2008). Une autre étude a montré que le méloxicam inhibe l'expression de la glycoprotéine-P dans les cellules HL60 (leucémie humaine à promyélocytes) et des cellules leucémiques de patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (Puhlmann, Ziemann et al. 2005). En revanche, notre étude montre que les inhibiteurs de COX-2 inhibent l'apoptose induite par différents agents chimiothérapeutiques dans plusieurs lignées cellulaires.

5.2.2 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose extrinsèque des lignées cellulaires

Comme l'apoptose intrinsèque est affectée par les inhibiteurs de COX-2, nous avons étudié l'effet du nimésulide et du NS-398 sur l'apoptose induite par FasL et le TNFα. Nous avons ainsi remarqué que le niveau d'apoptose induit par FasL, TRAIL ou le TNFα n'est pas modifié par le traitement des cellules U937 avec le nimésulide ou le NS-398. Une chimio-

sensibilisation par inhibition de COX-2 à l'apoptose extrinsèque a été observée dans d'autres types cellulaires comme des cellules tumorales coliques (Martin, Phillips et al. 2005). Les cellules traitées au DUP-697, un inhibiteur spécifique de COX-2, sont sensibilisées à l'apoptose induite par « TRAIL » (TNF-related apoptosis-inducing ligand) en raison d'une accumulation d'AA dans les cellules, ce qui conduit à l'activation de la sphingomyélinase qui déclenche une condensation des récepteurs de TRAIL au niveau de régions riches en céramides et cholestérol appelées « cavéoles ». L'apoptose physiologique (extrinsèque) active l'apoptose intrinsèque pour amplifier la réponse apoptotique *via* le clivage de la protéine Bid qui active Bax et Bak (Henshall, Bonislawski et al. 2001). Nous avons confirmé nos résultats en étudiant l'effet du nimésulide sur l'activation de Bax et Bak par FasL. Le nimésulide n'affecte pas l'activation de ces deux protéines par FasL. Les résultats nous ont donc appris que les inhibiteurs de COX-2 n'affectent pas directement l'activation de Bax et de Bak mais inhibent plutôt des événements plus précoces.

5.2.3 Les inhibiteurs de COX-2 préviennent l'apoptose intrinsèque avant l'initiation de l'apoptose.

Les résultats obtenus confirment que l'effet chimioprotecteur concerne l'apoptose intrinsèque en amont de l'activation de Bax et de Bak. Les kinases JNK et p38MAPK interviennent à un stade précoce de l'apoptose intrinsèque. Ces kinases induisent la phosphorylation activatrice de protéines pro-apoptotiques comme Bax par exemple, ou encore en phosphorylant des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL ou Bcl-2, conduisant à une suppression de leurs fonctions anti-apoptotiques (Basu and Haldar 2003; Kanda and Miura 2004 ; Wei, Sinha et al. 2008). Notre étude a démontré que l'étoposide induit l'activation de ces kinases et que les inhibiteurs de COX-2 préviennent cette activation. L'effet est corrélé à une diminution de la protéolyse de Bcl-2 induite par l'étoposide. Nos résultats ont ainsi démontré que l'apoptose intrinsèque est inhibée à un stade très précoce, ce qui suggère l'implication de mécanismes de chimiorésistance.

Une diminution de l'internalisation ou d'une augmentation du rejet des agents chimiothérapeutiques en dehors des cellules pourrait expliquer cette résistance aux agents chimiothérapeutiques. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'effet du nimésulide et du NS-398 sur l'apoptose intrinsèque induite par le peroxyde d'hydrogène qui a la capacité d'entrer librement dans la cellule et n'est pas la cible des protéines de la famille ABC (*par*

exemple, MRP, BCRP, P-gp). Les inhibiteurs de COX-2 n'affectent pas l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène. Notre étude a donc démontré que l'inhibition de l'apoptose intrinsèque n'est pas la conséquence de modulations ou d'altérations du mécanisme même de l'apoptose intrinsèque. L'inhibition de l'apoptose intrinsèque induite par les inhibiteurs de COX-2 pourrait être liée à une diminution de la concentration intracellulaire en agents chimiothérapeutiques. Un tel effet devrait s'accompagner d'une diminution des altérations de l'ADN induites par les agents chimiothérapeutiques. Par l'étude de la phosphorylation de l'histone H2AX (H2AXγ), un marqueur des cassures double brins de l'ADN, nous avons montré que les inhibiteurs de COX-2 inhibent les altérations de l'ADN induites par l'étoposide.

Tous nos résultats suggèrent que les inhibiteurs de COX-2 pourraient influencer l'expression ou l'activité de protéines impliquées dans l'import ou l'export des agents chimiothérapeutiques.

5.2.4 Effets des inhibiteurs de COX-2 sur des protéines de transport des agents chimiothérapeutiques

Récemment, une étude a montré que le célécoxib inhibe l'apoptose induite par le cisplatine dans un modèle de cancer de l'oesophage (Yu, Chen et al. 2011). Cet effet est la conséquence d'une inhibition de la protéine CTR1, qui permet l'import des agents chimiothérapeutiques dans la cellule. Aucune modulation de l'expression de cette protéine n'a été observée avec les inhibiteurs de COX-2. Cependant, nous n'excluons pas une éventuelle implication d'autres protéines impliquées dans l'importation des agents chimiothérapeutiques dans la cellule.

Nous avons alors émis l'hypothèse que des protéines permettant le rejet des agents chimiothérapeutiques en dehors des cellules pouvaient être impliquées. La famille ABC comme par exemple la glycoprotéine-P ou encore les protéines MRP permettent de rejeter les agents chimiothérapeutiques en dehors de la cellule et sont donc à l'origine de la chimiorésistance de nombreuses cellules tumorales (Luqmani 2005).

Nous avons dans un premier temps, proposé une implication de protéines MDR et nous nous sommes intéressés au niveau d'expression de l'ARNm et de la protéine MRP1 et MDR1 et nous avons ainsi pu observé que le traitement des cellules U937 avec le nimésulide, le NS-398 ou le célécoxib pendant 24h conduit à une augmentation de l'expression de ces

ARNm d'une manière dose dépendante. Cependant, au niveau protéique, aucune augmentation de ces deux protéines n'a été observée. Ces résultats montrent donc que ces deux protéines ne sont pas impliquées dans l'effet induit par les inhibiteurs de COX-2. Cependant, la piste des protéines de la famille ABC n'est pas exclue. En effet, d'autres protéines de cette famille pourraient être impliquées comme par exemple MRP6, BCRP (Huang and Sadee 2006). Plusieurs études ont énoncé que les inhibiteurs de COX-2 inhibent l'expression des protéines MDR. Une étude a révélé que le naproxène et l'indométacine heptyl ester, un métabolite de l'indométacine, sont capables d'inhiber l'expression de la glycoprotéine-P dans les cellules CACO-2 (lignée cellulaire de cancer humain colorectal). De plus, cette même étude a montré que l'indométacine inhibe l'activité de la glycoprotéine-P (Zrieki, Farinotti et al. 2008). De manière similaire, des travaux réalisés sur des cellules HL60 (leucémie humaine à promyélocytes) et des cellules de patients (leucémies myéloïdes aigues) ont démontré que le méloxicam diminue l'expression du gène MDR1 qui encode la glycoprotéine-P (Puhlmann, Ziemann et al. 2005).

A part une implication possible de protéines de la famille ABC, des enzymes de détoxification pourraient être impliquées dans notre modèle et permettre le métabolisme des agents chimiothérapeutiques. Plusieurs protéines pourraient donc être concernées comme la famille des cytochromes P450 ou encore d'autres enzymes de détoxification, comme le groupe des glutathion S-transferases (GST), des enzymes de détoxification de phase II qui peuvent conduire à un phénotype chimiorésistant (Townsend *et al.* 2003).

L'autophagie est une autre piste qui pourrait expliquer la résistance aux agents chimiothérapeutiques. Plusieurs études ont démontré que l'autophagie peut être un mécanisme de survie cellulaire qui peut être associée à une chimiorésistance. Par ailleurs, il a été montré que les cellules autophagiques sont positives au test de la β-galactosidase (Gerland, Peyrol et al. 2003). Nous avons de ce fait orienté l'étude dans le sens d'une induction d'autophagie. Nous avons ainsi montré une augmentation de la masse lysosomiale et une conversion de LC3. Nos résultats ont donc montré une induction d'autophagie dans les cellules U937 traitées par les inhibiteurs de COX-2. Ces résultats pourraient expliquer pourquoi les cellules deviennent résistantes à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques.

Notre étude a montré que les inhibiteurs de COX-2 conduisent à une protection à l'apoptose induite par plusieurs agents chimiothérapeutiques. Nos résultats suggèrent l'implication de plusieurs mécanismes avec d'une part, des protéines de la famille ABC et d'autre part, des enzymes de détoxification et une induction d'autophagie.

La concentration plasmatique moyenne de nimésulide est estimée à 20µM après une prise de 100mg avec un pic de concentration à 37,6 µM après une semaine de traitement (Bennett *et al.* 2000). Ces valeurs tiennent compte de la liaison du nimésulide aux protéines plasmatiques comme l'albumine. Par ailleurs, cette concentration peut être encore plus forte au niveau du site inflammatoire comme observé pour d'autres molécules pouvant se lier à l'albumine en raison d'un pH local plus faible (Bunczak-Reeh *et al.* 1998). Dans notre étude, un effet chimioprotecteur a pu être observé dès 10µM (dans des conditions avec 10% de sérum de veau fœtal), c'est à dire dans un rang de concentration thérapeutique. Les patients subissant des chimiothérapies peuvent développer des sites d'inflammation en raison de l'activation de macrophages consécutive à la mort des cellules tumorales (Mills *et al.* 2008). Nous pouvons donc concevoir que la concentration en inhibiteurs de COX-2 soit supérieure dans ces sites inflammatoires. Ces données bibliographiques, en accord avec nos résultats, suggèrent que l'association des inhibiteurs de COX-2 avec les agents chimiothérapeutiques doit être considérée avec prudence.

L'ensemble des résultats de cette partie de l'étude a été synthétisé dans la figure 87.

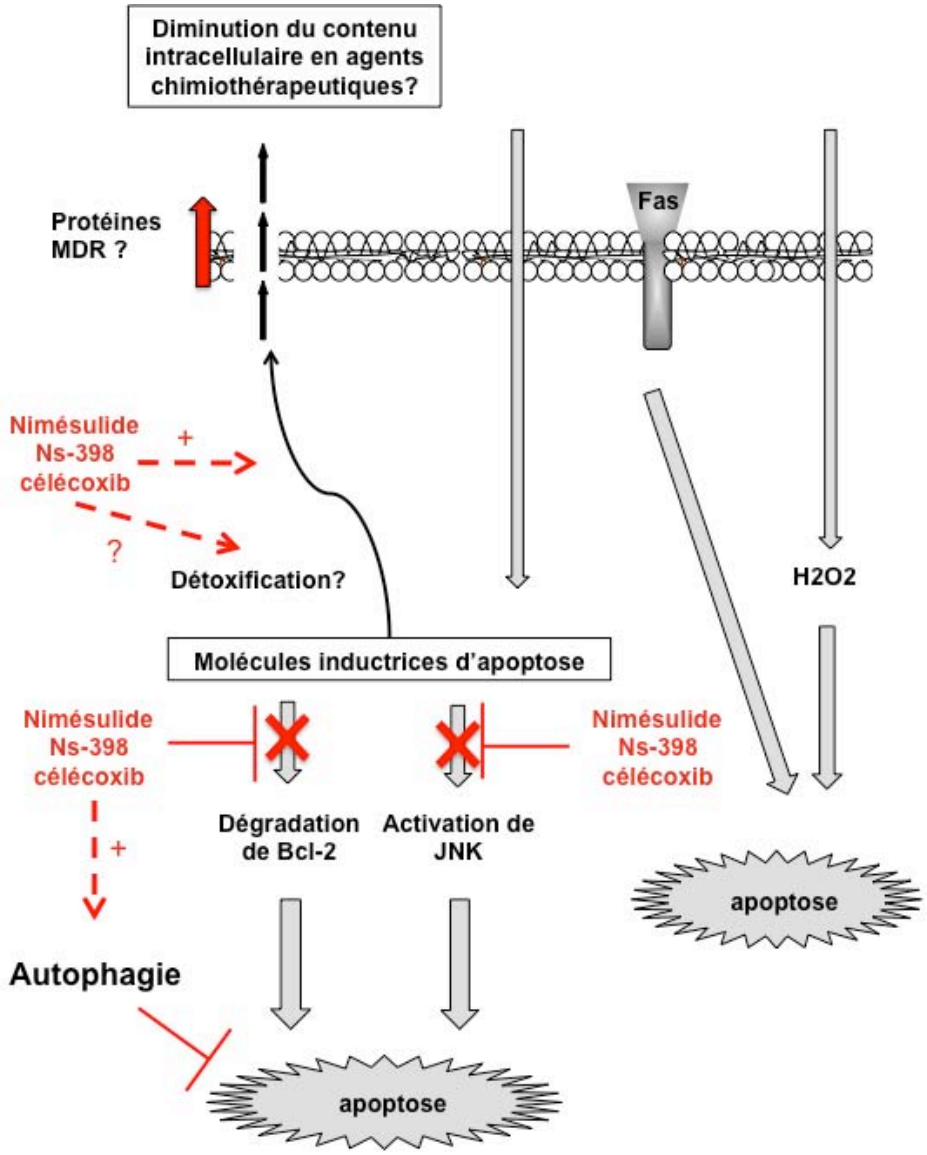


Figure 87 : Modèle d'action des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose induite par un stress (agents chimiothérapeutiques)

Notre étude a révélé que les inhibiteurs de COX-2 inhibent l'apoptose induite par différents agents chimiothérapeutiques mais pas celle induite par le peroxyde d'hydrogène ou l'apoptose physiologique induite par FasL, TRAIL ou le TNFα. L'étude a permis de montrer que la chimioprotection est associée à une diminution de la concentration intracellulaire en agents chimiothérapeutiques. Par ailleurs, une inhibition de l'activation de JNK et de la dégradation de Bcl-2 a été observée.

5.3 Etude des liens entre les différents effets induits par les inhibiteurs de COX-2

Dans notre étude, nous avons montré que les inhibiteurs de COX-2 inhibent la prolifération cellulaire en inhibant l'expression d'un oncogène, c-Myc. Nous avons également mis en évidence un effet chimioprotecteur pour plusieurs agents chimiothérapeutiques. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer le lien entre ces deux effets.

Nous avons montré que les cellules U937 traitées par les inhibiteurs de COX-2 rentrent dans un stade de différenciation plus avancé dans la voie granulocytaire. Des études ont montré que la différenciation cellulaire s'accompagne d'une diminution de la prolifération cellulaire et d'une résistance à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques (Ketley, Allen et al. 2000).

Un autre point important qui pourrait expliquer la chimiorésistance et l'effet sur le cycle cellulaire est l'autophagie. En effet, il a été démontré que l'induction d'autophagie est associée à une accumulation en phase G0/G1 du cycle cellulaire et peut engendrer une chimiorésistance. Par ailleurs, il semblerait que l'autophagie joue un rôle important pendant la différenciation cellulaire. En effet, durant la différenciation cellulaire, le métabolisme des cellules est considérablement diminué. Cependant la différenciation cellulaire demande une synthèse protéique et des remaniements morphologiques importants. L'autophagie pourrait permettre de fournir l'énergie nécessaire au bon déroulement de ces événements. Un lien entre l'autophagie et la différenciation myéloïde a déjà été montré (Wang *et al.* 2011). Une autre étude a démontré que l'autophagie est induite au cours du processus d'érythropoïèse (Lithanatudom *et al.* 2011). Dans ce sens, l'une des protéines clés pourrait être mTOR (mammalian target of rapamycine). Il s'agit d'une kinase qui est connue pour son rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et notamment dans la transition G1/S, en inhibant l'expression de p27 et en stimulant l'expression de la cycline D1 (Gera *et al.* 2004). Par ailleurs mTOR inhibe aussi l'autophagie en phosphorylant les protéines ATG (Autophagy genes) responsables de la formation des autophagosomes (Maiuri, Zalckvar et al. 2007). Un tel effet pourrait en partie expliquer la résistance aux agents chimiothérapeutiques. mTOR est une kinase qui est normalement activée par la PI3K. La protéine mTOR est aussi activée par la voie ERK1/2 (Carriere *et al.* 2011). Notre étude a révélé que les inhibiteurs de COX-2 inhibent la phosphorylation de ERK1/2. Cet effet pourrait conduire à une diminution de la phosphorylation de mTOR. Notre étude ayant montré une induction de différenciation

cellulaire et d'autophagie, nous pouvons désormais émettre l'hypothèse d'un lien entre ces deux événements.

Plus généralement, l'accumulation des cellules en phase G0/G1 conduit à une diminution du nombre de cellules pendant la synthèse d'ADN. Cependant, les agents chimiothérapeutiques que nous avons utilisé ciblent cette synthèse pour induire l'apoptose. C'est notamment le cas de l'étoposide, du méthotrexate, de la cytarabine. Néanmoins, nous avons observé un effet chimioprotecteur pour des temps de traitement courts avec les inhibiteurs de COX-2. Ces résultats ne peuvent donc pas que s'expliquer par l'accumulation en phase G0/G1 du cycle cellulaire.

c-Myc pourrait aussi avoir un rôle central dans notre étude. Récemment, des études ont suggéré que c-Myc pouvait indépendamment de son action sur le cycle cellulaire, jouer un rôle dans l'apoptose (Prendergast 1999). c-Myc pourrait par exemple contrôler la libération du cytochrome c par un mécanisme encore inconnu (Prendergast 1999).

5.4 Effet de la curcumine et de la combinaison curcumine /célécoxib sur la prolifération et l'apoptose des cellules U937 et K562

L'utilisation chronique des inhibiteurs de COX-2 s'accompagne de nombreux effets secondaires avec notamment une augmentation du risque d'infarctus du myocarde ou encore des ulcères gastro-intestinaux (van Staa *et al.* 2008). Par conséquent, il est important de trouver d'autres stratégies pour inhiber COX-2. De nombreuses substances d'origine naturelle ont montré une activité antitumorale et anti-inflammatoire (*par exemple*, l'humulone, la tetrandrine) (Surh 2003). Ces substances ont toutes la capacité d'inhiber l'expression de COX-2 plutôt que son activité et pourraient présenter moins d'effets secondaires que les inhibiteurs classiques. Par conséquent, ces molécules pourraient remplacer les inhibiteurs de COX-2 actuellement utilisés. Par ailleurs, ces molécules pourraient permettre de potentialiser les effets des inhibiteurs de COX-2. Des études ont déjà montré que la combinaison de produits naturels avec des inhibiteurs de COX-2 a des effets bénéfiques en inhibant plus efficacement la prolifération des cellules tumorales ou en induisant l'apoptose (Lev-Ari, Strier et al. 2005).

Suivant cet objectif, nous avons dans un premier temps, étudié l'effet de la curcumine, un polyphénol provenant du rhizome de *Curcuma longa*, sur la prolifération et sur l'apoptose

des différentes lignées cellulaires. Pour des concentrations supérieures à 5µM, la curcumine induit l'apoptose de toutes les lignées cellulaires. L'effet pro-apoptotique de la curcumine a déjà été observé dans d'autres travaux. En effet, le traitement des lignées OE21, KYSE450 et OE33 (carcinome de l'oesophage) avec 15µM de curcumine après 24h, provoque aussi l'apoptose de ces cellules (Dempe *et al.* 2008). Par ailleurs, l'effet apoptotique de la curcumine sur des cellules de carcinomes du côlon a aussi été montré (Kim *et al.* 2010). L'effet apoptotique de la curcumine est connu et nos résultats sont en accord avec les données bibliographiques.

Nous avons ensuite montré qu'une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire, et notamment une accumulation de cellules en prophase/métaphase, précède l'induction d'apoptose. De nombreuses publications montrent que la curcumine induit l'apoptose en induisant un arrêt des cellules en phase S et G2/M du cycle cellulaire (Giladi *et al.* 2010; Lee *et al.* 2011 ; Lu *et al.* 2011). Une étude menée par B. Aggarwal a donné des résultats similaires sur d'autres types cellulaires. En effet, une augmentation du nombre de cellules en phase S et G2 après traitement par 10µM de curcumine pendant 24h a été observée sur les lignées RT4V6 (cancer de la vessie), et sur la lignée KU-7 (Cellules humaines de carcinome de la vessie) (Kamat *et al.* 2007). Notre étude est donc en accord avec les données bibliographiques.

L'accumulation en phase S et G2/M du cycle cellulaire a été associée à une induction de catastrophes mitotiques (Dempe, Pfeiffer et al. 2008). La catastrophe mitotique correspond une incapacité des cellules à terminer normalement la mitose qui peut aboutir à l'apoptose. Ce type d'altération cellulaire met en jeu des protéines impliquées dans la surveillance de la mitose (Vitale *et al.* 2011). Une induction de catastrophes mitotiques par la curcumine a notamment été décrite dans un modèle leucémique (leucémie myéloïde chronique possédant le chromosome de Philadelphie) (Wolanin *et al.* 2006).

Dans la mesure où le célécoxib conduit à une accumulation des cellules U937 en phase G0/G1 du cycle cellulaire et que la curcumine conduit à une accumulation en phase S et G2/M, nous avons émis l'hypothèse que le prétraitement avec le célécoxib, suivi d'un cotraitement avec la curcumine, pourrait permettre une meilleure inhibition de la prolifération cellulaire ou une meilleure induction de l'apoptose, en ciblant le cycle cellulaire à des phases distinctes. Cependant, notre étude a mis en évidence une diminution de l'apoptose induite par la curcumine. Cet effet a été associé au fait que les cellules qui s'accumulent en phase G0/G1 n'atteignent pas la phase du cycle cellulaire qui est perturbée par la curcumine. Des effets

similaires ont été obtenus avec le co-traitement. Toutes nos données suggèrent que cette stratégie combinatoire n'augmente pas les effets de la curcumine. Dans la mesure où des études similaires, réalisées sur des modèles de tumeurs solides, ont plutôt démontré des effets synergiques ou additifs (Lev-Ari, Strier et al. 2005), nos résultats suggèrent une réponse différentielle dans les modèles hématologiques.

5.5 Effet du 2,5-Diméthyl-célécoxib sur la prolifération et l'apoptose des cellules U937 et K562

Notre étude a montré que le célécoxib inhibe la prolifération de nos lignées cellulaires et induit une diminution de l'expression de c-Myc. Nos résultats ont suggéré que ces effets étaient indépendants de l'inhibition de COX-2. Les effets secondaires des inhibiteurs spécifiques de COX-2 sont la conséquence de l'inhibition de l'activité enzymatique de COX-2 (voir section 1.1.5). L'augmentation du risque d'infarctus et d'accidents vasculaires cérébraux associés à l'utilisation chronique d'inhibiteurs de COX-2 a conduit au retrait de certains médicaments du marché (*par exemple*, le rofécoxib). Ces inhibiteurs ont pour la plupart démontré un effet antitumoral dans de nombreux types cellulaires et cette propriété n'est pas toujours corrélée à l'inhibition de l'activité de COX-2. Par conséquent, de nombreuses études ont été réalisées afin de trouver le moyen de garder les effets bénéfiques et de supprimer ou du moins limiter les effets néfastes de ces molécules. Dans ce contexte, le DMC a été développé. Le DMC présente une structure presque identique à celle du célécoxib, mais ne possède pas la capacité d'inhiber l'activité enzymatique de COX-2 (Kardosh, Wang et al. 2005). Cette molécule pourrait donc présenter moins d'effets délétères que le célécoxib. Par ailleurs, le DMC a démontré un effet antitumoral plus important que le célécoxib dans plusieurs types de cancers où il induit notamment une diminution de la prolifération cellulaire et une induction d'apoptose (Backhus *et al.* 2005 ; Kardosh, Wang et al. 2005 ; Schonthal 2006 ; Schonthal, Chen et al. 2008). Cependant peu d'études ont été réalisées sur l'effet de cette molécule sur des modèles hématologiques. Les données actuellement disponible montrent que le DMC inhibe la prolifération de cellules de lymphomes de Burkitt *via* une diminution de l'expression de la cycline A et B (Kardosh, Wang et al. 2005). Une autre étude a montré un effet similaire sur des lignées cellulaires de myélomes multiples où une diminution de l'activation de STAT3, une inhibition de MEK, de l'expression de la survivine, des cycline A et B ont été observées (Kardosh *et al.* 2005).

Notre étude a démontré que cette molécule a un effet pro-apoptotique et antiprolifératif plus important que le célécoxib. Ces résultats supportent donc l'idée que cet analogue de célécoxib possède des propriétés antitumorales prometteuses.

6 Conclusion

Les inhibiteurs de COX-2 présentent la capacité d'inhiber la prolifération cellulaire de différentes lignées cellulaires et conduisent à une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire pour la lignée U937. Ce blocage est corrélé à une diminution de l'expression de c-Myc. Notre étude a montré que cet effet est la conséquence d'une diminution de la transcription de c-Myc ainsi que de sa traduction protéique. c-Myc est une protéine qui est surexprimée dans de nombreux cancers et contribue à l'agressivité des tumeurs (Klapproth and Wirth 2010). Sa dérégulation est la cause de certaines maladies, comme par exemple le lymphome de Burkitt ainsi que de leucémies (Prochownik 2004; Smith, Anastasi et al. 2010). Par conséquent, de nombreux efforts sont dédiés à la recherche de moyens permettant de diminuer l'expression ou l'activité de cet oncogène (Prochownik 2004). Notre étude suggère l'utilisation des inhibiteurs de COX-2 pour cibler cette protéine. Par ailleurs, notre étude a montré que les inhibiteurs de COX-2 conduisent les lignées de leucémie myéloïdes aiguës (Hel et U937) à un stade de différenciation plus avancé. Notre étude suggère donc l'utilisation des inhibiteurs de COX-2 dans les thérapies visant à différencier les cellules tumorales.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons montré que les inhibiteurs de COX-2 conduisent à une chimioprotection de nos différents modèles cellulaires. Notre projet suggère donc que la combinaison des inhibiteurs de COX-2 avec des agents chimiothérapeutiques n'est pas une bonne solution dans ces modèles. Notre étude nous a permis de montrer que cette inhibition de l'apoptose intrinsèque se produit à un stade très précoce, avant même l'induction des mécanismes d'apoptose. Nos travaux ont notamment suggéré une implication possible de protéines de rejet des agents chimiothérapeutiques ou encore des mécanismes de détoxification cellulaire.

Les inhibiteurs de COX-2 sont associés à de nombreux effets secondaires et par conséquent, le déséquilibre entre les effets néfastes par rapport aux effets bénéfiques a conduit au retrait de certaines de ces molécules du marché. Notre étude a proposé deux stratégies pour limiter ces effets néfastes. La première a consisté à combiner les inhibiteurs de COX-2 avec la curcumine, afin d'obtenir une meilleure réponse antitumorale. Cependant notre étude a démontré que les inhibiteurs de COX-2 contrecarrent l'effet pro-apoptotique de la curcumine.

La deuxième stratégie a consisté à utiliser un analogue du célécoxib, le DMC. Nous avons ainsi montré que cette molécule induit plus fortement l'apoptose et diminue plus fortement la prolifération des cellules U937 et K562. Le fait que cette molécule soit dénuée de la capacité d'inhiber l'activité de COX-2 suggère un avenir prometteur en thérapie.

7 Perspectives

7.1 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur la prolifération et le cycle cellulaire de lignées tumorales hématologiques

Les inhibiteurs de COX-2 inhibent la transcription de l'oncogène c-Myc *via* une inhibition de la voie ERK. La transcription de c-Myc est régulée par d'autres oncogènes dont l'activation dépend de ERK ou d'autres voies de signalisation. Les oncogène c-Fos et c-Jun qui forment le complexe AP-1 sont connus pour être activés par ERK1/2 ou encore JNK et augmentent la transcription de c-Myc (Vartanian *et al.* 2011). Par ailleurs, d'autres voies de signalisation intracellulaires seront aussi considérées, comme par exemple la voie Wnt/β-caténine qui régule aussi la transcription de c-Myc (Xia, Pei et al. 2010).

Les inhibiteurs de COX-2 inhibent la traduction de c-Myc. Cet effet a été corrélé à une augmentation de l'expression des miRs Let-7c et Let-7f et a donc suggéré un mécanisme spécifique de c-Myc. Nous envisageons d'étudier l'expression de protéines régulatrices de la traduction de c-Myc comme par exemple, les protéines TIAR ou TIA-1 qui sont des protéines se fixant sur la région 3'NT de l'ARNm de c-Myc. Cependant, une étude a montré que le célécoxib peut inhiber la globalité de la traduction protéique (Pyrko *et al.* 2008). Dans ces conditions, la diminution de l'expression de c-Myc serait la conséquence d'un effet global. Nous envisageons de confirmer cet effet en réalisant une extraction de polyribosomes. Nous avons des données préliminaires à ce propos. La distribution des ARNs dans les polysomes a été étudiée dans les cellules U937 traitées à 100µM de célécoxib pendant 24h (Figure 88 A). Nos résultats ont ainsi montré qu'il y a une augmentation de la quantité d'ARNs libres et une diminution de la quantité d'ARNs dans les fractions correspondant aux monosomes (ARN faiblement traduits) et aux polysomes (ARNs fortement traduits). La kinase mTOR pourrait aussi être impliquée. En effet, mTOR joue un rôle important dans la traduction protéique en phosphorylant les protéines 4-EBP-1 et p70S6K, ce qui va permettre l'initiation de la synthèse protéique (Gibbons *et al.* 2009). Nous avons étudié la phosphorylation de mTOR sur la sérine 2448 dans les cellules U937 traitées pendant 24h avec différentes concentrations de célécoxib (Figure 88). Nous avons observé une diminution de la phosphorylation de mTOR. Cet effet, s'il est confirmé, pourrait expliquer la diminution de synthèse protéique et l'induction d'autophagie.

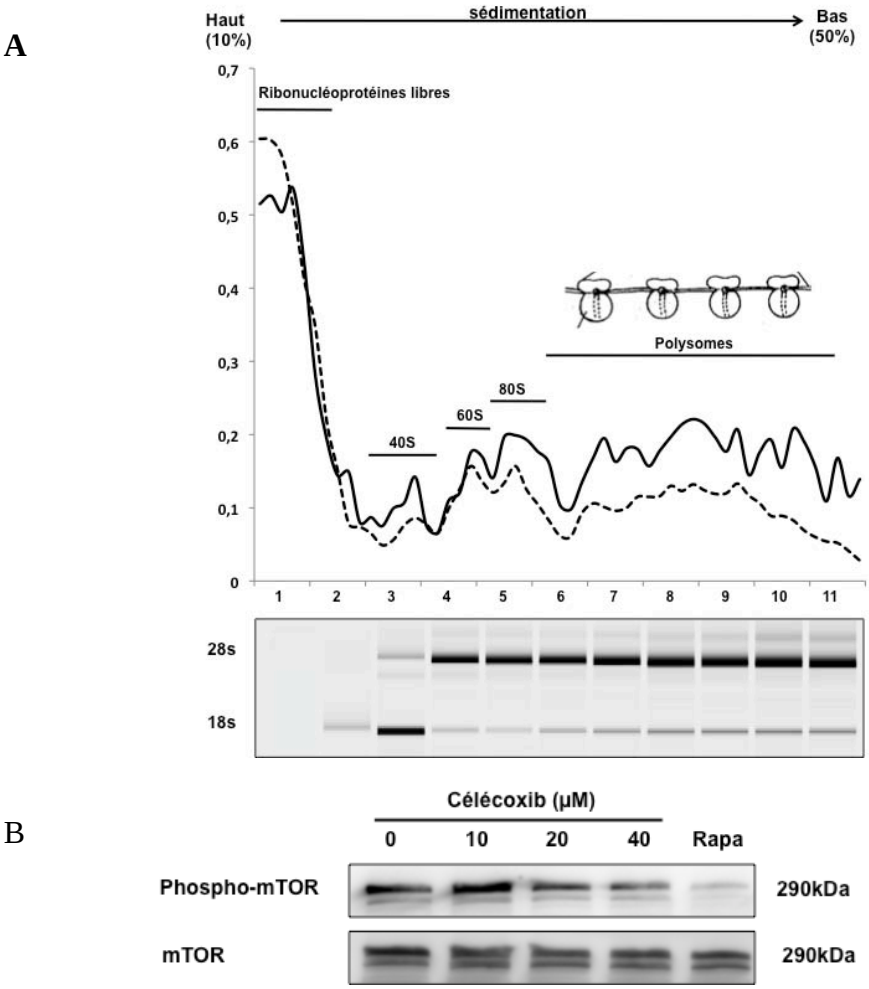


Figure 88 : Effet du célécoxib sur la distribution des ARNs dans les polysomes

Les cellules U937 ont été traitées par 100µM de célécoxib. Puis nous avons extrait l'ARN de ces cellules que nous avons déposé sur un gradient de sucrose (10-50%). Après ultracentrifugation (150000g pendant 4h), les fractions correspondant aux ARNs libres, aux monosomes et aux polysomes ont été récupérées. La nature de ces fractions a été révélée en mesurant la présence des ARNr 18S et 28S. La quantité d'ARN a été mesurée dans chaque fraction en mesurant la densité optique à 254 nm (**A**). L'expression de la protéine mTOR phosphorylée sur la sérine 2448 a été étudiée par Western Blot dans les cellules U937 traitées pendant 24h à différentes concentrations de célécoxib (0, 10, 20, 40µM) (**B**). Le profil de phosphorylation de mTOR a été normalisé par l'expression totale de mTOR.

Notre étude a permis de mettre en évidence une induction de la différenciation cellulaire et de l'autophagie dans les cellules U937 traitées aux inhibiteurs de COX-2. Nous envisageons d'étudier si un lien existe entre ces deux phénomènes biologiques. Pour se faire, nous envisageons d'utiliser des inhibiteurs d'autophagie comme par exemple la bafilomycine ou encore des inducteurs comme la rapamycine.

Plusieurs études ont montré que l'inhibition de COX-2 s'accompagne d'une accumulation d'AA dans la cellule (Pawliczak *et al.* 2002). Des travaux montrent que cette accumulation peut conduire à l'activation de PPARγ, un récepteur nucléaire ayant un effet anti-inflammatoire (Dubuquoy, Rousseaux et al. 2006). Les agonistes de PPARγ comme la rosiglitazone ou encore la ciglitazone ont déjà montré des effets antiprolifératifs sur différents modèles cellulaires comme par exemple le cancer du côlon mais aussi la leucémie myéloïde aigüe (Ferreira-Silva *et al.* 2008). Ainsi, nous envisageons d'étudier l'implication de l'AA et de PPARγ dans l'effet médié par les inibiteurs de COX-2 sur la prolifération cellulaire.

7.2 Effet d'inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose des lignées cellulaires hématologiques

Nous avons observé que les cellules U937 deviennent résistantes à l'apoptose induite par l'étoposide, le cisplatine, la camptothécine, la doxorubicine, l'irinotécan, le méthotrexate si les cellules subissent un prétraitement de 24h avec du nimésulide, du NS-398 ou du célécoxib. Nous avons émis l'hypothèse que cet effet pourrait être lié à une augmentation de l'expression de protéines permettant l'expulsion des agents chimiothérapeutiques en dehors de la cellule. Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de MRP1 ou de MDR1 au niveau protéique. Cependant, nous envisageons d'étudier l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur l'expression des autres protéines de la famille ABC.

Nous avons aussi émis l'hypothèse que des mécanismes de détoxification pourraient être impliqués dans la chimiorésistance induite par les inhibiteurs de COX-2. Dans ce sens, nous envisageons d'étudier l'expression/l'activité d'enzyme de détoxification comme par exemple la glutathion *S*-transferase-P1 (GSTP1), une protéine qui joue un rôle important dans la détoxification en permettant notamment une conjugaison des xénobiotiques avec du glutathion (Townsend and Tew 2003). Par ailleurs, GSTP1 pourrait moduler la réponse apoptotique aux agents chimiothérapeutiques par une modulation de la voie JNK. Il a été montré que GSTP1 peut former un complexe avec JNK1 pour inhiber cette voie et que le peroxyde d'hydrogène peut inhiber la formation de ce complexe et restaure l'activité de JNK1

(Adler, Yin et al. 1999) et donc la sensibilité aux stimuli apoptotiques comme les agents chimiothérapeutiques. Il sera donc important d'étudier l'interaction entre GSTP1 et JNK dans les cellules traitées par les inhibiteurs de COX-2 puis par l'étoposide. Cet effet pourrait être observé par co-immunoprécipitation de GSTP1 avec JNK1. La voie JNK semble jouer un rôle important dans l'apoptose en phosphorylant des protéines de la famille Bcl-2 comme par exemple Bcl-2, ce qui conduit à sa dégradation, ou encore Bax et Bak pour conduire à leur activation. L'une de nos perspectives consistera à analyser l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur la phosphorylation de ces protéines. Nous utiliserons aussi des inhibiteurs de JNK (*i.e*, SP600125) pour voir si un effet chimioprotecteur peut être obtenu. Des résultats préliminaires ont montré que le traitement des cellules U937 avec cet inhibiteur conduit à une protection à l'apoptose induite par la curcumine (données non montrées)

Précédemment, nous avons observé que durant l'apoptose, il y a phosphorylation de H2AX et que celle-ci est inhibée si les cellules sont prétraitées par le nimésulide. Cette phosphorylation nécessite l'intervention des JNK (Sluss *et al.* 2006). Afin de vérifier si la phosphorylation de H2AX dans les cellules U937, passe par cette kinase, nous étudierons l'impact du SP600125, un inhibiteur de JNK sur la phosphorylation de H2AX induite par l'étoposide.

Les mécanismes de résistance peuvent faire intervenir diverses voies de signalisation. Afin de comprendre le mécanisme impliqué dans la résistance de nos cellules leucémiques, nous envisageons d'évaluer l'effet des deux inhibiteurs spécifiques sur plusieurs voies de survie. La voie PI3K/Akt conduit à la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad conduisant à sa séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (Fang *et al.* 1999). Nous envisageons d'étudier l'effet des inhibiteurs de COX-2 sur la phosphorylation de cette protéine.

7.3 Effet de la curcumine et de la combinaison curcumine /célécoxib sur la prolifération et l'apoptose des cellules U937 et K562

Concernant la partie sur la combinaison curcumine / célécoxib, nous envisageons d'identifier le mécanisme impliqué dans l'effet régulé par la curcumine. L'accumulation en phase S et G2/M du cycle cellulaire a été associée à une induction de catastrophes mitotiques (Dempe, Pfeiffer et al. 2008). Dans un modèle leucémique (leucémie myéloïde chronique), il a été

démontré que la curcumine inhibe l'expression de protéines du complexe chromosomal passager, un complexe protéique important pour l'attachement des microtubules au niveau des kinétochores des chromosomes (Wolanin, Magalska et al. 2006). Cet effet conduit à un blocage des cellules en prophase / métaphase de la mitose. L'effet observé au niveau de la phase G2/M du cycle cellulaire et plus précisément au niveau de la mitose suggère un effet sur la catastrophe mitotique. Notre étude de la curcumine pourrait donc s'étendre dans cette voie.

Références bibliographiques

ABELEV G.I.
Differentiation mechanisms and malignancy.
Biochemistry (Mosc), 2000, **65**(1): 107-116.

ADHAMI V.M., MALIK A., ZAMAN N., SARFARAZ S., SIDDIQUI I.A., SYED D.N., AFAQ F., PASHA F.S., SALEEM M. and MUKHTAR H.
Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both in vitro and in vivo.
Clin Cancer Res, 2007, **13**(5): 1611-1619.

ADLER V., YIN Z., FUCHS S.Y., BENEZRA M., ROSARIO L., TEW K.D., PINCUS M.R., SARDANA M., HENDERSON C.J., WOLF C.R., DAVIS R.J. and RONAI Z.
Regulation of JNK signaling by GSTp.
EMBO J, 1999, **18**(5): 1321-1334.

AGARWAL M.L., AGARWAL A., TAYLOR W.R. and STARK G.R.
p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, **92**(18): 8493-8497.

AGGARWAL B.B.
Nuclear factor-kappaB: the enemy within.
Cancer Cell, 2004, **6**(3): 203-208.

AL-SALIHI M.A., ULMER S.C., DOAN T., NELSON C.D., CROTTY T., PRESCOTT S.M., STAFFORINI D.M. and TOPHAM M.K.
Cyclooxygenase-2 transactivates the epidermal growth factor receptor through specific E-prostanoid receptors and tumor necrosis factor-alpha converting enzyme.
Cell Signal, 2007, **19**(9): 1956-1963.

ALMOG N.
Molecular mechanisms underlying tumor dormancy.
Cancer Lett, 2010, **294**(2): 139-146.

AMANO H., HAYASHI I., ENDO H., KITASATO H., YAMASHINA S., MARUYAMA T., KOBAYASHI M., SATOH K., NARITA M., SUGIMOTO Y., MURATA T., YOSHIMURA H., NARUMIYA S. and MAJIMA M.
Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth.
J Exp Med, 2003, **197**(2): 221-232.

ANTMAN E.M., DEMETS D. and LOSCALZO J.
Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk.
Circulation, 2005, **112**(5): 759-770.

AUDIC Y. and HARTLEY R.S.
Post-transcriptional regulation in cancer.
Biol Cell, 2004, **96**(7): 479-498.

BACKHUS L.M., PETASIS N.A., UDDIN J., SCHONTHAL A.H., BART R.D., LIN Y., STARNES V.A. and BREMNER R.M.
Dimethyl celecoxib as a novel non-cyclooxygenase 2 therapy in the treatment of non-small cell lung cancer.
J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, **130**(5): 1406-1412.

BALKWILL F. and MANTOVANI A.
Inflammation and cancer: back to Virchow?
Lancet, 2001, **357**(9255): 539-545.

BASU A. and HALDAR S.
Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis.
FEBS Lett, 2003, **538**(1-3): 41-47.

BAUVY C., GANE P., ARICO S., CODOGNO P. and OGIER-DENIS E.
Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29.
Exp Cell Res, 2001, **268**(2): 139-149.

BELL D.W., VARLEY J.M., SZYDLO T.E., KANG D.H., WAHRER D.C., SHANNON K.E., LUBRATOVICH M., VERSELIS S.J., ISSELBACHER K.J., FRAUMENI J.F., BIRCH J.M., LI F.P., GARBER J.E. and HABER D.A.
Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome.
Science, 1999, **286**(5449): 2528-2531.

BENNETT A. and VILLA G.
Nimesulide: an NSAID that preferentially inhibits COX-2, and has various unique pharmacological activities.
Expert Opin Pharmacother, 2000, **1**(2): 277-286.

BHUI K., PRASAD S., GEORGE J. and SHUKLA Y.
Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway.
Cancer Lett, 2009, **282**(2): 167-176.

BILLEN L.P., KOKOSKI C.L., LOVELL J.F., LEBER B. and ANDREWS D.W.
Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax.
PLoS Biol, 2008, **6**(6): e147.

BLAGOSKLONNY M.V.
Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation.
Leukemia, 2001, **15**(6): 869-874.

BODO A., BAKOS E., SZERI F., VARADI A. and SARKADI B.
The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity.
Toxicol Lett, 2003, **140-141**: 133-143.

BOS J.L.

ras oncogenes in human cancer: a review.
Cancer Res, 1989, **49**(17): 4682-4689.

BOUGHTON-SMITH N.K., HAWKEY C.J. and WHITTLE B.J.
Biosynthesis of lipoxygenase and cyclo-oxygenase products from [14C]-arachidonic acid by human colonic mucosa.
Gut, 1983, **24**(12): 1176-1182.

BRADFORD M.M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem, 1976, **72**: 248-254.

BREITSCHOPF K., HAENDELER J., MALCHOW P., ZEIHER A.M. and DIMMELER S.
Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway.
Mol Cell Biol, 2000, **20**(5): 1886-1896.

BREYER R.M., BAGDASSARIAN C.K., MYERS S.A. and BREYER M.D.
Prostanoid receptors: subtypes and signaling.
Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001, **41**: 661-690.

BROWN K.K. and HAMPTON M.B.
Biological targets of isothiocyanates.
Biochim Biophys Acta, 2011,
BRUNE B., VON KNETHEN A. and SANDAU K.B.
Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis.
Cell Death Differ, 1999, **6**(10): 969-975.

BUECHNER J., TOMTE E., HAUG B.H., HENRIKSEN J.R., LOKKE C., FLAEGSTAD T. and EINVIK C.
Tumour-suppressor microRNAs let-7 and mir-101 target the proto-oncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma.
Br J Cancer, 2011,
BUNCZAK-REEH M.A. and HARGREAVES K.M.
Effect of inflammation on the delivery of drugs to dental pulp.
J Endod, 1998, **24**(12): 822-825.

BUOLAMWINI J.K.
Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery.
Curr Pharm Des, 2000, **6**(4): 379-392.

BURLACU A.
Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins.
J Cell Mol Med, 2003, **7**(3): 249-257.

CAO Y. and PRESCOTT S.M.
Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer.
J Cell Physiol, 2002, **190**(3): 279-286.

CAREW J.S., NAWROCKI S.T. and CLEVELAND J.L.
Modulating autophagy for therapeutic benefit.
Autophagy, 2007, **3**(5): 464-467.

CARRIERE A., ROMEO Y., ACOSTA-JAQUEZ H.A., MOREAU J., BONNEIL E., THIBAULT P., FINGAR D.C. and ROUX P.P.
ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1).
J Biol Chem, 2011, **286**(1): 567-577.

CASADO M., CALLEJAS N.A., RODRIGO J., ZHAO X., DEY S.K., BOSCA L. and MARTIN-SANZ P.
Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy.
FASEB J, 2001, **15**(11): 2016-2018.

CASADO M., MOLLA B., ROY R., FERNANDEZ-MARTINEZ A., CUCARELLA C., MAYORAL R., BOSCA L. and MARTIN-SANZ P.
Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes.
Hepatology, 2007, **45**(3): 631-638.

CASTELLONE M.D., TERAMOTO H., WILLIAMS B.O., DRUEY K.M. and GUTKIND J.S.
Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis.
Science, 2005, **310**(5753): 1504-1510.

CERELLA C., SOBOLEWSKI C., DICATO M. and DIEDERICH M.
Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy.
Biochem Pharmacol, 2010, **80**(12): 1801-1815.

CHA Y.J., KIM H.S., RHIM H., KIM B.E., JEONG S.W. and KIM I.K.
Activation of caspase-8 in 3-deazaadenosine-induced apoptosis of U-937 cells occurs downstream of caspase-3 and caspase-9 without Fas receptor-ligand interaction.
Exp Mol Med, 2001, **33**(4): 284-292.

CHABNER B.A. and ROBERTS T.G., JR.
Timeline: Chemotherapy and the war on cancer.
Nat Rev Cancer, 2005, **5**(1): 65-72.

CHAI J., DU C., WU J.W., KYIN S., WANG X. and SHI Y.
Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO.
Nature, 2000, **406**(6798): 855-862.

CHAIAMNUAY S., ALLISON J.J. and CURTIS J.R.
Risks versus benefits of cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal antiinflammatory drugs.
Am J Health Syst Pharm, 2006, **63**(19): 1837-1851.

CHAN M.W., WONG C.Y., CHENG A.S., CHAN V.Y., CHAN K.K., TO K.F., CHAN F.K., SUNG J.J. and LEUNG W.K.
Targeted inhibition of COX-2 expression by RNA interference suppresses tumor growth and potentiates chemosensitivity to cisplatin in human gastric cancer cells.
Oncol Rep, 2007, **18**(6): 1557-1562.

CHAN T.A., MORIN P.J., VOGELSTEIN B. and KINZLER K.W.
Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, **95**(2): 681-686.

CHANDRASEKHARAN N.V., DAI H., ROOS K.L., EVANSON N.K., TOMSIK J., ELTON T.S. and SIMMONS D.L.
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, 2002, **99**(21): 13926-13931.

CHANDRASEKHARAN N.V. and SIMMONS D.L.
The cyclooxygenases.
Genome Biol, 2004, **5**(9): 241.

CHANG Y.W., JAKOBI R., MCGINTY A., FOSCHI M., DUNN M.J. and SOROKIN A.
Cyclooxygenase 2 promotes cell survival by stimulation of dynein light chain expression and inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity.
Mol Cell Biol, 2000, **20**(22): 8571-8579.

CHEN C., SHEN H.L., YANG J., CHEN Q.Y. and XU W.L.
Preventing chemoresistance of human breast cancer cell line, MCF-7 with celecoxib.
J Cancer Res Clin Oncol, 2011, **137**(1): 9-17.

CHEN S., QIONG Y. and GARDNER D.G.
A role for p38 mitogen-activated protein kinase and c-myc in endothelin-dependent rat aortic smooth muscle cell proliferation.
Hypertension, 2006, **47**(2): 252-258.

CHEN X.J., XIAO W., QU X. and ZHOU S.Y.
NS-398 enhances the efficacy of gemcitabine against lung adenocarcinoma through up-regulation of p21WAF1 and p27KIP1 protein.
Neoplasma, 2008, **55**(3): 200-204.

CHOI E.M., KWAK S.J., KIM Y.M., HA K.S., KIM J.I., LEE S.W. and HAN J.A.
COX-2 inhibits anoikis by activation of the PI-3K/Akt pathway in human bladder cancer cells.
Exp Mol Med, 2005, **37**(3): 199-203.

CHOI S.H. and BOSETTI F.
Cyclooxygenase-1 null mice show reduced neuroinflammation in response to beta-amyloid.
Aging (Albany NY), 2009, **1**(2): 234-244.

CHRISTOFFERSEN N.R., SHALGI R., FRANKEL L.B., LEUCCI E., LEES M., KLAUSEN M., PILPEL Y., NIELSEN F.C., OREN M. and LUND A.H.

p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC.
Cell Death Differ, **17**(2): 236-245.

CIARDIELLO F. and TORTORA G.
Inhibition of bcl-2 as cancer therapy.
Ann Oncol, 2002, **13**(4): 501-502.

COBRINIK D.
Pocket proteins and cell cycle control.
Oncogene, 2005, **24**(17): 2796-2809.

COGLIANO V.J., BAAN R. and STRAIF K.
Updating IARC's carcinogenicity assessment of benzene.
Am J Ind Med, 2011, **54**(2): 165-167.

COLUSSI C., ALBERTINI M.C., COPPOLA S., ROVIDATI S., GALLI F. and GHIBELLI L.
H2O2-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis.
FASEB J, 2000, **14**(14): 2266-2276.

COPELAND R.A., WILLIAMS J.M., GIANNARAS J., NURNBERG S., COVINGTON M., PINTO D., PICK S. and TRZASKOS J.M.
Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, **91**(23): 11202-11206.

COPPOLA S. and GHIBELLI L.
GSH extrusion and and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling.
Biochem Soc Trans, 2000, **28**(2): 56-61.

COUSSENS L.M. and WERB Z.
Inflammation and cancer.
Nature, 2002, **420**(6917): 860-867.

D'ALESSIO M., CERELLA C., AMICI C., PESCE C., COPPOLA S., FANELLI C., DE NICOLA M., CRISTOFANON S., CLAVARINO G., BERGAMASCHI A., MAGRINI A., GUALANDI G. and GHIBELLI L.
Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO-resistant cells.
Faseb J, 2004, **18**(13): 1609-1611.

D'ALESSIO M., DE NICOLA M., COPPOLA S., GUALANDI G., PUGLIESE L., CERELLA C., CRISTOFANON S., CIVITAREALE P., CIRIOLO M.R., BERGAMASCHI A., MAGRINI A. and GHIBELLI L.
Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis.
Faseb J, 2005, **19**(11): 1504-1506.

D'ANDREA A.D.
Targeting DNA repair pathways in AML.

Best Pract Res Clin Haematol, 2010, **23**(4): 469-473.

DAKSIS J.I., LU R.Y., FACCHINI L.M., MARHIN W.W. and PENN L.J.
Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle.
Oncogene, 1994, **9**(12): 3635-3645.

DAMSTRUP L., KUWADA S.K., DEMPSEY P.J., BROWN C.L., HAWKEY C.J., POULSEN H.S., WILEY H.S. and COFFEY R.J., JR.
Amphiregulin acts as an autocrine growth factor in two human polarizing colon cancer lines that exhibit domain selective EGF receptor mitogenesis.
Br J Cancer, 1999, **80**(7): 1012-1019.

DARZYNKIEWICZ Z., HALICKA D.H. and TANAKA T.
Cytometric assessment of DNA damage induced by DNA topoisomerase inhibitors.
Methods Mol Biol, 2009, **582**: 145-153.

DAVIS R.J.
Transcriptional regulation by MAP kinases.
Mol Reprod Dev, 1995, **42**(4): 459-467.

DE BRAEKELEER E., DOUET-GUILBERT N., ROWE D., BOWN N., MOREL F., BERTHOU C., FEREC C. and DE BRAEKELEER M.
ABL1 fusion genes in hematological malignancies: a review.
Eur J Haematol, 2011, **86**(5): 361-371.

DE CHIARA G., MARCOCCI M.E., TORCIA M., LUCIBELLO M., ROSINI P., BONINI P., HIGASHIMOTO Y., DAMONTE G., ARMIROTTI A., AMODEI S., PALAMARA A.T., RUSSO T., GARACI E. and COZZOLINO F.
Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences.
J Biol Chem, 2006, **281**(30): 21353-21361.

DEMPE J.S., PFEIFFER E., GRIMM A.S. and METZLER M.
Metabolism of curcumin and induction of mitotic catastrophe in human cancer cells.
Mol Nutr Food Res, 2008, **52**(9): 1074-1081.

DENNIS L.K., LYNCH C.F. and TORNER J.C.
Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer.
Urology, 2002, **60**(1): 78-83.

DENT P., YACOUB A. and GRANT S.
DMC: novel celecoxib derivatives to rap cancer.
Cancer Biol Ther, 2005, **4**(5): 583-584.

DIMBERG A. and OBERG F.
Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines.
Leuk Lymphoma, 2003, **44**(10): 1641-1650.

DIMMELER S., BREITSCHOPF K., HAENDELER J. and ZEIHER A.M.

Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway.
J Exp Med, 1999, **189**(11): 1815-1822.

DIMRI G.P., LEE X., BASILE G., ACOSTA M., SCOTT G., ROSKELLEY C., MEDRANO E.E., LINSKENS M., RUBELJ I., PEREIRA-SMITH O. and ET AL.
A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, **92**(20): 9363-9367.

DING G., CHENG L., QIN Q., FRONTIN S. and YANG Q.
PPARdelta modulates lipopolysaccharide-induced TNFalpha inflammation signaling in cultured cardiomyocytes.
J Mol Cell Cardiol, 2006, **40**(6): 821-828.

DOGAN A.L., LEGRAND O., FAUSSAT A.M., PERROT J.Y. and MARIE J.P.
Evaluation and comparison of MRP1 activity with three fluorescent dyes and three modulators in leukemic cell lines.
Leuk Res, 2004, **28**(6): 619-622.

DOHERTY G.A., BYRNE S.M., MOLLOY E.S., MALHOTRA V., AUSTIN S.C., KAY E.W., MURRAY F.E. and FITZGERALD D.J.
Proneoplastic effects of PGE2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer.
BMC Cancer, 2009, **9**: 207.

DUBOIS R.N., ABRAMSON S.B., CROFFORD L., GUPTA R.A., SIMON L.S., VAN DE PUTTE L.B. and LIPSKY P.E.
Cyclooxygenase in biology and disease.
Faseb J, 1998, **12**(12): 1063-1073.

DUBUQUOY L., ROUSSEAUX C., THURU X., PEYRIN-BIROULET L., ROMANO O., CHAVATTE P., CHAMAILLARD M. and DESREUMAUX P.
PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases.
Gut, 2006, **55**(9): 1341-1349.

DUNN K.L., ESPINO P.S., DROBIC B., HE S. and DAVIE J.R.
The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling.
Biochem Cell Biol, 2005, **83**(1): 1-14.

EISINGER A.L., NADAULD L.D., SHELTON D.N., PETERSON P.W., PHELPS R.A., CHIDESTER S., STAFFORINI D.M., PRESCOTT S.M. and JONES D.A.
The adenomatous polyposis coli tumor suppressor gene regulates expression of cyclooxygenase-2 by a mechanism that involves retinoic acid.
J Biol Chem, 2006, **281**(29): 20474-20482.

ESPINOSA E., ZAMORA P., FELIU J. and GONZALEZ BARON M.
Classification of anticancer drugs--a new system based on therapeutic targets.
Cancer Treat Rev, 2003, **29**(6): 515-523.

FALANDRY C., CANNEY P.A., FREYER G. and DIRIX L.Y.

Role of combination therapy with aromatase and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with metastatic breast cancer.
Ann Oncol, 2009, **20**(4): 615-620.

FANG X., YU S., EDER A., MAO M., BAST R.C., JR., BOYD D. and MILLS G.B.
Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway.
Oncogene, 1999, **18**(48): 6635-6640.

FERREIRA-SILVA V., RODRIGUES A.C., HIRATA T.D., HIRABARA S.M. and CURI R.
Effects of 15-deoxy-Delta12, 14 prostaglandin J2 and ciglitazone on human cancer cell cycle progression and death: the role of PPARgamma.
Eur J Pharmacol, 2008, **580**(1-2): 80-86.

FUCHS C.S.
The role of aspirin in prevention and management of colorectal cancer.
Clin Adv Hematol Oncol, 2011, **9**(4): 330-332.

FUKUYAMA T., ICHIKI Y., YAMADA S., SHIGEMATSU Y., BABA T., NAGATA Y., MIZUKAMI M., SUGAYA M., TAKENOYAMA M., HANAGIRI T., SUGIO K. and YASUMOTO K.
Cytokine production of lung cancer cell lines: Correlation between their production and the inflammatory/immunological responses both in vivo and in vitro.
Cancer Sci, 2007, **98**(7): 1048-1054.

FULDA S. and DEBATIN K.M.
Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy.
Oncogene, 2006, **25**(34): 4798-4811.

FULLARD J.F., KALE A. and BAKER N.E.
Clearance of apoptotic corpses.
Apoptosis, 2009,
FURUKAWA Y.
Cell cycle control during hematopoietic cell differentiation.
Hum Cell, 1997, **10**(3): 159-164.

GAO P., TCHERNYSHYOV I., CHANG T.C., LEE Y.S., KITA K., OCHI T., ZELLER K.I., DE MARZO A.M., VAN EYK J.E., MENDELL J.T. and DANG C.V.
c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism.
Nature, 2009, **458**(7239): 762-765.

GARTEL A.L. and SHCHORS K.
Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes.
Exp Cell Res, 2003, **283**(1): 17-21.

GERA J.F., MELLINGHOFF I.K., SHI Y., RETTIG M.B., TRAN C., HSU J.H., SAWYERS C.L. and LICHTENSTEIN A.K.
AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression.

J Biol Chem, 2004, **279**(4): 2737-2746.

GERLAND L.M., PEYROL S., LALLEMAND C., BRANCHE R., MAGAUD J.P. and FFRENCH M.
Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging.
Exp Gerontol, 2003, **38**(8): 887-895.

GHIBELLI L., FANELLI C., ROTILIO G., LAFAVIA E., COPPOLA S., COLUSSI C., CIVITAREALE P. and CIRIOLO M.R.
Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion.
Faseb J, 1998, **12**(6): 479-486.

GIBBONS J.J., ABRAHAM R.T. and YU K.
Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth.
Semin Oncol, 2009, **36 Suppl 3**: S3-S17.

GILADI N., KAZANOV D., SHPITZ B., AROCH I., KRAUS S. and ARBER N.
Curcumin potentiates the pro-apoptotic effects of sulindac sulfone in colorectal cancer.
Expert Opin Investig Drugs, 2010, **19 Suppl 1**: S117-124.

GILHOOLY E.M. and ROSE D.P.
The association between a mutated ras gene and cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cell lines.
Int J Oncol, 1999, **15**(2): 267-270.

GOEL A., PRASAD A.K., PARMAR V.S., GHOSH B. and SAINI N.
Apoptogenic effect of 7,8-diacetoxy-4-methylcoumarin and 7,8-diacetoxy-4-methylthiocoumarin in human lung adenocarcinoma cell line: role of NF-kappaB, Akt, ROS and MAP kinase pathway.
Chem Biol Interact, 2009, **179**(2-3): 363-374.

GONZALEZ-PERIZ A. and CLARIA J.
New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways.
Curr Top Med Chem, 2007, **7**(3): 297-309.

GRANT R. and IRONSIDE J.W.
Glutathione S-transferases and cytochrome P450 detoxifying enzyme distribution in human cerebral glioma.
J Neurooncol, 1995, **25**(1): 1-7.

GREEN G.A.
Understanding NSAIDs: from aspirin to COX-2.
Clin Cornerstone, 2001, **3**(5): 50-60.

GRESNER P., GROMADZINSKA J. and WASOWICZ W.
Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer.
Lung Cancer, 2007, **57**(1): 1-25.

GRIFFITHS G.J., DUBREZ L., MORGAN C.P., JONES N.A., WHITEHOUSE J., CORFE B.M., DIVE C. and HICKMAN J.A.
Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis.
J Cell Biol, 1999, **144**(5): 903-914.

GROSCH S., MAIER T.J., SCHIFFMANN S. and GEISSLINGER G.
Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors.
J Natl Cancer Inst, 2006, **98**(11): 736-747.

GROSSMANN J.
Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis".
Apoptosis, 2002, **7**(3): 247-260.

GUALDRINI F., CORVETTA D., CANTILENA S., CHAYKA O., TANNO B., RASCHELLA G. and SALA A.
Addiction of MYCN amplified tumours to B-MYB underscores a reciprocal regulatory loop.
Oncotarget, 2010, **1**(4): 278-288.

HANAHAN D. and WEINBERG R.A.
Hallmarks of cancer: the next generation.
Cell, 2011, **144**(5): 646-674.

HARPER C.E., PATEL B.B., WANG J., ELTOUM I.A. and LAMARTINIERE C.A.
Epigallocatechin-3-Gallate suppresses early stage, but not late stage prostate cancer in TRAMP mice: mechanisms of action.
Prostate, 2007, **67**(14): 1576-1589.

HARRIS S.G., PADILLA J., KOUMAS L., RAY D. and PHIPPS R.P.
Prostaglandins as modulators of immunity.
Trends Immunol, 2002, **23**(3): 144-150.

HARTWIG A.
Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights.
Biometals, 2010, **23**(5): 951-960.

HASSAN H.T. and FREUND M.
Characteristic biological features of human megakaryoblastic leukaemia cell lines.
Leuk Res, 1995, **19**(9): 589-594.

HENSHALL D.C., BONISLAWSKI D.P., SKRADSKI S.L., LAN J.Q., MELLER R. and SIMON R.P.
Cleavage of bid may amplify caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures.
Neurobiol Dis, 2001, **8**(4): 568-580.

HINZ B. and BRUNE K.
Cyclooxygenase-2--10 years later.

J Pharmacol Exp Ther, 2002, **300**(2): 367-375.

HINZ B., CHEREMINA O. and BRUNE K.
Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man.
Faseb J, 2008, **22**(2): 383-390.

HOFFMAN B., AMANULLAH A., SHAFARENKO M. and LIEBERMANN D.A.
The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis.
Oncogene, 2002, **21**(21): 3414-3421.

HOFFMAN J.G.
Theory of the mitotic index and its application to tissue growth measurement.
Bull Math Biophys, 1949, **11**(2): 139-144.

HONJO S., OSAKI M., ARDYANTO T.D., HIRAMATSU T., MAETA N. and ITO H.
COX-2 inhibitor, NS398, enhances Fas-mediated apoptosis via modulation of the PTEN-Akt pathway in human gastric carcinoma cell lines.
DNA Cell Biol, 2005, **24**(3): 141-147.

HOSTANSKA K., JURGENLIEMK G., ABEL G., NAHRSTEDT A. and SALLER R.
Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells.
Cancer Detect Prev, 2007, **31**(2): 129-139.

HOWE L.R.
Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer.
Breast Cancer Res, 2007, **9**(4): 210.

HUANG Y. and SADEE W.
Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells.
Cancer Lett, 2006, **239**(2): 168-182.

HUDSON M., RAHME E., RICHARD H. and PILOTE L.
Risk of congestive heart failure with nonsteroidal antiinflammatory drugs and selective Cyclooxygenase 2 inhibitors: a class effect?
Arthritis Rheum, 2007, **57**(3): 516-523.

HURLIN P.J. and DEZFOULI S.
Functions of myc:max in the control of cell proliferation and tumorigenesis.
Int Rev Cytol, 2004, **238**: 183-226.

HUSSAIN S.P. and HARRIS C.C.
Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials.
Int J Cancer, 2007, **121**(11): 2373-2380.

IRWIN M.S. and MILLER F.D.
p73: regulator in cancer and neural development.
Cell Death Differ, 2004, **11 Suppl 1**: S17-22.

JAENISCH R. and BIRD A.

Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.
Nat Genet, 2003, **33 Suppl**: 245-254.

JAMSHIDI F., ZHANG J., HARRISON J.S., WANG X. and STUDZINSKI G.P.
Induction of differentiation of human leukemia cells by combinations of COX inhibitors and 1,25-dihydroxyvitamin D3 involves Raf1 but not Erk 1/2 signaling.
Cell Cycle, 2008, **7**(7): 917-924.

JAYADEV S., LINARDIC C.M. and HANNUN Y.A.
Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha.
J Biol Chem, 1994, **269**(8): 5757-5763.

JENDROSSEK V., HANDRICK R. and BELKA C.
Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway.
Faseb J, 2003, **17**(11): 1547-1549.

JESAM C., SALVATIERRA A.M., SCHWARTZ J.L. and CROXATTO H.B.
Suppression of follicular rupture with meloxicam, a cyclooxygenase-2 inhibitor: potential for emergency contraception.
Hum Reprod, 2010, **25**(2): 368-373.

JI Y., HE Y., LIU L. and ZHONG X.
MiRNA-26b regulates the expression of cyclooxygenase-2 in desferrioxamine-treated CNE cells.
FEBS Lett, **584**(5): 961-967.

JOHANSEN L.M., IWAMA A., LODIE T.A., SASAKI K., FELSHER D.W., GOLUB T.R. and TENEN D.G.
c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis.
Mol Cell Biol, 2001, **21**(11): 3789-3806.

JOHNSEN J.I., LINDSKOG M., PONTHAN F., PETTERSEN I., ELFMAN L., ORREGO A., SVEINBJORNSSON B. and KOGNER P.
NSAIDs in neuroblastoma therapy.
Cancer Lett, 2005, **228**(1-2): 195-201.

JOHNSON G.E., IVANOV V.N. and HEI T.K.
Radiosensitization of melanoma cells through combined inhibition of protein regulators of cell survival.
Apoptosis, 2008, **13**(6): 790-802.

JONES T.R. and COLE M.D.
Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of the 3' untranslated sequences.
Mol Cell Biol, 1987, **7**(12): 4513-4521.

JUNTTILA M.R. and WESTERMARCK J.
Mechanisms of MYC stabilization in human malignancies.
Cell Cycle, 2008, **7**(5): 592-596.

KAMAT A.M., SETHI G. and AGGARWAL B.B.
Curcumin potentiates the apoptotic effects of chemotherapeutic agents and cytokines through down-regulation of nuclear factor-kappaB and nuclear factor-kappaB-regulated gene products in IFN-alpha-sensitive and IFN-alpha-resistant human bladder cancer cells.
Mol Cancer Ther, 2007, **6**(3): 1022-1030.

KANDA H. and MIURA M.
Regulatory roles of JNK in programmed cell death.
J Biochem, 2004, **136**(1): 1-6.

KANG C.D., HAN C.S., KIM K.W., DO I.R., KIM C.M., KIM S.H., LEE E.Y. and CHUNG B.S.
Activation of NF-kappaB mediates the PMA-induced differentiation of K562 cells.
Cancer Lett, 1998, **132**(1-2): 99-106.

KARDOSH A., SORIANO N., LIU Y.T., UDDIN J., PETASIS N.A., HOFMAN F.M., CHEN T.C. and SCHONTHAL A.H.
Multitarget inhibition of drug-resistant multiple myeloma cell lines by dimethyl-celecoxib (DMC), a non-COX-2 inhibitory analog of celecoxib.
Blood, 2005, **106**(13): 4330-4338.

KARDOSH A., WANG W., UDDIN J., PETASIS N.A., HOFMAN F.M., CHEN T.C. and SCHONTHAL A.H.
Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo.
Cancer Biol Ther, 2005, **4**(5): 571-582.

KELKEL M., JACOB C., DICATO M. and DIEDERICH M.
Potential of the dietary antioxidants resveratrol and curcumin in prevention and treatment of hematologic malignancies.
Molecules, 2010, **15**(10): 7035-7074.

KELKEL M., SCHUMACHER M., DICATO M. and DIEDERICH M.
Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene.
Free Radic Res, 2011,
KELLER U., NILSSON J.A., MACLEAN K.H., OLD J.B. and CLEVELAND J.L.
Nfkb 1 is dispensable for Myc-induced lymphomagenesis.
Oncogene, 2005, **24**(41): 6231-6240.

KELMAN Z.
PCNA: structure, functions and interactions.
Oncogene, 1997, **14**(6): 629-640.

KETLEY N.J., ALLEN P.D., KELSEY S.M. and NEWLAND A.C.
Mechanisms of resistance to apoptosis in human AML blasts: the role of differentiation-induced perturbations of cell-cycle checkpoints.
Leukemia, 2000, **14**(4): 620-628.

KHALIMONCHUK O. and RODEL G.
Biogenesis of cytochrome c oxidase.
Mitochondrion, 2005, **5**(6): 363-388.

KIM H.H., KUWANO Y., SRIKANTAN S., LEE E.K., MARTINDALE J.L. and GOROSPE M.
HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression.
Genes Dev, 2009, **23**(15): 1743-1748.

KIM K.C. and LEE C.
Curcumin Induces Downregulation of E2F4 Expression and Apoptotic Cell Death in HCT116 Human Colon Cancer Cells; Involvement of Reactive Oxygen Species.
Korean J Physiol Pharmacol, 2010, **14**(6): 391-397.

KIM N., KIM C.H., AHN D.W., LEE K.S., CHO S.J., PARK J.H., LEE M.K., KIM J.S., JUNG H.C. and SONG I.S.
Anti-gastric cancer effects of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, through inhibition of Akt signaling.
J Gastroenterol Hepatol, 2009, **24**(3): 480-487.

KINNER A., WU W., STAUDT C. and ILIAKIS G.
Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin.
Nucleic Acids Res, 2008, **36**(17): 5678-5694.

KIRKLAND T.N. and VIRIYAKOSOL S.
Structure-function analysis of soluble and membrane-bound CD14.
Prog Clin Biol Res, 1998, **397**: 79-87.

KIS B., SNIPES J.A., ISSE T., NAGY K. and BUSIJA D.W.
Putative cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells.
J Cereb Blood Flow Metab, 2003, **23**(11): 1287-1292.

KITAGAWA K., KOTAKE Y. and KITAGAWA M.
Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products.
Cancer Sci, 2009, **100**(8): 1374-1381.

KITAGAWA Y., WONG F., LO P., ELLIOTT M., VERBURGT L.M., HOGG J.C. and DAYA M.
Overexpression of Bcl-2 and mutations in p53 and K-ras in resected human non-small cell lung cancers.
Am J Respir Cell Mol Biol, 1996, **15**(1): 45-54.

KLAPPROTH K. and WIRTH T.
Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis.
Br J Haematol, **149**(4): 484-497.

KLAPPROTH K. and WIRTH T.
Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis.
Br J Haematol, 2010, **149**(4): 484-497.

KOPP E. and GHOSH S.
Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin.
Science, 1994, **265**(5174): 956-959.

KULINSKY V.I.
Biochemical aspects of inflammation.
Biochemistry (Mosc), 2007, **72**(6): 595-607.

KUPPERS R.
The biology of Hodgkin's lymphoma.
Nat Rev Cancer, 2009, **9**(1): 15-27.

KURUMBAIL R.G., STEVENS A.M., GIERSE J.K., MCDONALD J.J., STEGEMAN R.A., PAK J.Y., GILDEHAUS D., MIYASHIRO J.M., PENNING T.D., SEIBERT K., ISAKSON P.C. and STALLINGS W.C.
Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents.
Nature, 1996, **384**(6610): 644-648.

KURZ D.J., DECARY S., HONG Y. and ERUSALIMSKY J.D.
Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells.
J Cell Sci, 2000, **113 (Pt 20)**: 3613-3622.

LAFON I., CARBALLES F., BREWER G., POIRET M. and MORELLO D.
Developmental expression of AUF1 and HuR, two c-myc mRNA binding proteins.
Oncogene, 1998, **16**(26): 3413-3421.

LARREA M.D., LIANG J., DA SILVA T., HONG F., SHAO S.H., HAN K., DUMONT D. and SLINGERLAND J.M.
Phosphorylation of p27Kip1 regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4.
Mol Cell Biol, 2008, **28**(20): 6462-6472.

LAU L.M., WOLTER J.K., LAU J.T., CHENG L.S., SMITH K.M., HANSFORD L.M., ZHANG L., BARUCHEL S., ROBINSON F. and IRWIN M.S.
Cyclooxygenase inhibitors differentially modulate p73 isoforms in neuroblastoma.
Oncogene, 2009, **28**(19): 2024-2033.

LEE S.J., KRAUTHAUSER C., MADUSKUIE V., FAWCETT P.T., OLSON J.M. and RAJASEKARAN S.A.
Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo.
BMC Cancer, 2011, **11**: 144.

LEI K., NIMNUAL A., ZONG W.X., KENNEDY N.J., FLAVELL R.A., THOMPSON C.B., BAR-SAGI D. and DAVIS R.J.
The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase.
Mol Cell Biol, 2002, **22**(13): 4929-4942.

LEV-ARI S., STRIER L., KAZANOV D., MADAR-SHAPIRO L., DVORY-SOBOL H., PINCHUK I., MARIAN B., LICHTENBERG D. and ARBER N.
Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells.
Clin Cancer Res, 2005, **11**(18): 6738-6744.

LI J., CHEN X., DONG X., XU Z., JIANG H. and SUN X.
Specific COX-2 inhibitor, meloxicam, suppresses proliferation and induces apoptosis in human HepG2 hepatocellular carcinoma cells.
J Gastroenterol Hepatol, 2006, **21**(12): 1814-1820.

LI M., WU X. and XU X.C.
Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway.
Clin Cancer Res, 2001, **7**(4): 1010-1016.

LIAO B., HU Y. and BREWER G.
Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation.
Nat Struct Mol Biol, 2007, **14**(6): 511-518.

LIOU J.Y., GHELANI D., YEH S. and WU K.K.
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by suppressing 14-3-3epsilon.
Cancer Res, 2007, **67**(7): 3185-3191.

LITHANATUDOM P., WANNATUNG T., LEECHAROENKIAT A., SVASTI S., FUCHAROEN S. and SMITH D.R.
Enhanced activation of autophagy in beta-thalassemia/Hb E erythroblasts during erythropoiesis.
Ann Hematol, 2011, **90**(7): 747-758.

LIU B., SHI Z.L., FENG J. and TAO H.M.
Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 via down-regulation of PI3K/Akt.
Cell Biol Int, 2008, **32**(5): 494-501.

LIU X.H., YAO S., KIRSCHENBAUM A. and LEVINE A.C.
NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells.
Cancer Res, 1998, **58**(19): 4245-4249.

LLEONART M.E., ARTERO-CASTRO A. and KONDOH H.
Senescence induction; a possible cancer therapy.
Mol Cancer, 2009, **8**: 3.

LOZZIO C.B. and LOZZIO B.B.
Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.
Blood, 1975, **45**(3): 321-334.

LU J.J., CAI Y.J. and DING J.

Curcumin induces DNA damage and caffeine-insensitive cell cycle arrest in colorectal carcinoma HCT116 cells.
Mol Cell Biochem, 2011, **354**(1-2): 247-252.

LUQMANI Y.A.
Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy.
Med Princ Pract, 2005, **14 Suppl 1**: 35-48.

MA X., KUNDU N., RIFAT S., WALSER T. and FULTON A.M.
Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis.
Cancer Res, 2006, **66**(6): 2923-2927.

MA X., YANG Q., WILSON K.T., KUNDU N., MELTZER S.J. and FULTON A.M.
Promoter methylation regulates cyclooxygenase expression in breast cancer.
Breast Cancer Res, 2004, **6**(4): R316-321.

MAIURI M.C., ZALCKVAR E., KIMCHI A. and KROEMER G.
Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis.
Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, **8**(9): 741-752.

MAJIMA M., HAYASHI I., MURAMATSU M., KATADA J., YAMASHINA S. and KATORI M.
Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants.
Br J Pharmacol, 2000, **130**(3): 641-649.

MAJNO G. and JORIS I.
Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.
Am J Pathol, 1995, **146**(1): 3-15.

MALEMPATI S., TIBBITTS D., CUNNINGHAM M., AKKARI Y., OLSON S., FAN G. and SEARS R.C.
Aberrant stabilization of c-Myc protein in some lymphoblastic leukemias.
Leukemia, 2006, **20**(9): 1572-1581.

MARDEROSIAN M., SHARMA A., FUNK A.P., VARTANIAN R., MASRI J., JO O.D. and GERA J.F.
Tristetraprolin regulates Cyclin D1 and c-Myc mRNA stability in response to rapamycin in an Akt-dependent manner via p38 MAPK signaling.
Oncogene, 2006, **25**(47): 6277-6290.

MARIN Y.E., WALL B.A., WANG S., NAMKOONG J., MARTINO J.J., SUH J., LEE H.J., RABSON A.B., YANG C.S., CHEN S. and RYU J.H.
Curcumin downregulates the constitutive activity of NF-kappaB and induces apoptosis in novel mouse melanoma cells.
Melanoma Res, 2007, **17**(5): 274-283.

MARNETT L.J.
Mechanisms of cyclooxygenase-2 inhibition and cardiovascular side effects: the plot thickens.
Cancer Prev Res (Phila), 2009, **2**(4): 288-290.

MARTIN P. and PAPAYANNOPOULOU T.
HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression.
Science, 1982, **216**(4551): 1233-1235.

MARTIN S., PHILLIPS D.C., SZEKELY-SZUCS K., ELGHAZI L., DESMOTS F. and HOUGHTON J.A.
Cyclooxygenase-2 inhibition sensitizes human colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through clustering of DR5 and concentrating death-inducing signaling complex components into ceramide-enriched caveolae.
Cancer Res, 2005, **65**(24): 11447-11458.

MARTIN S.A., LORD C.J. and ASHWORTH A.
Therapeutic targeting of the DNA mismatch repair pathway.
Clin Cancer Res, 2010, **16**(21): 5107-5113.

MARTIN-LATIL S., MOUSSON L., AUTRET A., COLBERE-GARAPIN F. and BLONDEL B.
Bax is activated during rotavirus-induced apoptosis through the mitochondrial pathway.
J Virol, 2007, **81**(9): 4457-4464.

MASLOW K.D. and LYONS E.A.
Effect of prostaglandin and antiprostaglandin on midcycle myometrial contractions.
Fertil Steril, 2004, **82**(2): 511-513.

MASSAGUE J.
G1 cell-cycle control and cancer.
Nature, 2004, **432**(7015): 298-306.

MAZAN-MAMCZARZ K., LAL A., MARTINDALE J.L., KAWAI T. and GOROSPE M.
Translational repression by RNA-binding protein TIAR.
Mol Cell Biol, 2006, **26**(7): 2716-2727.

MBONYE U.R. and SONG I.
Posttranscriptional and posttranslational determinants of cyclooxygenase expression.
BMB Rep, 2009, **42**(9): 552-560.

MBONYE U.R., WADA M., RIEKE C.J., TANG H.Y., DEWITT D.L. and SMITH W.L.
The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system.
J Biol Chem, 2006, **281**(47): 35770-35778.

MBONYE U.R., YUAN C., HARRIS C.E., SIDHU R.S., SONG I., ARAKAWA T. and SMITH W.L.
Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation.
J Biol Chem, 2008, **283**(13): 8611-8623.

MCGAHON A., BISSONNETTE R., SCHMITT M., COTTER K.M., GREEN D.R. and COTTER T.G.

BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death.
Blood, 1994, **83**(5): 1179-1187.

MELLO C.C. and CONTE D., JR.
Revealing the world of RNA interference.
Nature, 2004, **431**(7006): 338-342.

MESRI E.A., CESARMAN E. and BOSHOFF C.
Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus.
Nat Rev Cancer, 2010, **10**(10): 707-719.

MILLS P.J., ANCOLI-ISRAEL S., PARKER B., NATARAJAN L., HONG S., JAIN S., SADLER G.R. and VON KANEL R.
Predictors of inflammation in response to anthracycline-based chemotherapy for breast cancer.
Brain Behav Immun, 2008, **22**(1): 98-104.

MIRODDI M., CALAPAI F. and CALAPAI G.
Potential beneficial effects of garlic in oncohematology.
Mini Rev Med Chem, 2011, **11**(6): 461-472.

MUTTER R., LU B., CARBONE D.P., CSIKI I., MORETTI L., JOHNSON D.H., MORROW J.D., SANDLER A.B., SHYR Y., YE F. and CHOY H.
A phase II study of celecoxib in combination with paclitaxel, carboplatin, and radiotherapy for patients with inoperable stage IIIA/B non-small cell lung cancer.
Clin Cancer Res, 2009, **15**(6): 2158-2165.

NAKANISHI Y., KAMIJO R., TAKIZAWA K., HATORI M. and NAGUMO M.
Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukaemia cell lines.
Eur J Cancer, 2001, **37**(12): 1570-1578.

NAKAYAMA F., NISHIHARA S., IWASAKI H., KUDO T., OKUBO R., KANEKO M., NAKAMURA M., KARUBE M., SASAKI K. and NARIMATSU H.
CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase IV.
J Biol Chem, 2001, **276**(19): 16100-16106.

NAM S.Y., KIM J.S., KIM J.M., LEE J.Y., KIM N., JUNG H.C. and SONG I.S.
DA-6034, a derivative of flavonoid, prevents and ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis and inhibits colon carcinogenesis.
Exp Biol Med (Maywood), 2008, **233**(2): 180-191.

NARUMIYA S. and FITZGERALD G.A.
Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function.
J Clin Invest, 2001, **108**(1): 25-30.

NEMETH J.F., HOCHGESANG G.P., JR., MARNETT L.J. and CAPRIOLI R.M.
Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry.

Biochemistry, 2001, **40**(10): 3109-3116.

NIEDERBERGER E., MANDERSCHEID C. and GEISSLINGER G.
Different COX-independent effects of the COX-2 inhibitors etoricoxib and lumiracoxib.
Biochem Biophys Res Commun, 2006, **342**(3): 940-948.

NO J.H., KIM M.K., JEON Y.T., KIM Y.B. and SONG Y.S.
Human papillomavirus vaccine: widening the scope for cancer prevention.
Mol Carcinog, 2011, **50**(4): 244-253.

OKUNO S., SAITO A., HAYASHI T. and CHAN P.H.
The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia.
J Neurosci, 2004, **24**(36): 7879-7887.

PAI R., SOREGHAN B., SZABO I.L., PAVELKA M., BAATAR D. and TARNAWSKI A.S.
Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy.
Nat Med, 2002, **8**(3): 289-293.

PALAYOOR S.T., ARAYANKALAYIL M.J., SHOAIBI A. and COLEMAN C.N.
Radiation sensitivity of human carcinoma cells transfected with small interfering RNA targeted against cyclooxygenase-2.
Clin Cancer Res, 2005, **11**(19 Pt 1): 6980-6986.

PANDEY M.K., SANDUR S.K., SUNG B., SETHI G., KUNNUMAKKARA A.B. and AGGARWAL B.B.
Butein, a tetrahydroxychalcone, inhibits nuclear factor (NF)-kappaB and NF-kappaB-regulated gene expression through direct inhibition of IkappaBalpha kinase beta on cysteine 179 residue.
J Biol Chem, 2007, **282**(24): 17340-17350.

PARFENOVA H., BALABANOVA L. and LEFFLER C.W.
Posttranslational regulation of cyclooxygenase by tyrosine phosphorylation in cerebral endothelial cells.
Am J Physiol, 1998, **274**(1 Pt 1): C72-81.

PARK C., MOON D.O., CHOI I.W., CHOI B.T., NAM T.J., RHU C.H., KWON T.K., LEE W.H., KIM G.Y. and CHOI Y.H.
Curcumin induces apoptosis and inhibits prostaglandin E(2) production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis.
Int J Mol Med, 2007, **20**(3): 365-372.

PARK M.K., KANG Y.J., HA Y.M., JEONG J.J., KIM H.J., SEO H.G., LEE J.H. and CHANG K.C.
EP2 receptor activation by prostaglandin E2 leads to induction of HO-1 via PKA and PI3K pathways in C6 cells.
Biochem Biophys Res Commun, 2009, **379**(4): 1043-1047.

PAUL B.Z., ASHBY B. and SHETH S.B.
Distribution of prostaglandin IP and EP receptor subtypes and isoforms in platelets and human umbilical artery smooth muscle cells.
Br J Haematol, 1998, **102**(5): 1204-1211.

PAWLICZAK R., HAN C., HUANG X.L., DEMETRIS A.J., SHELHAMER J.H. and WU T.
85-kDa cytosolic phospholipase A2 mediates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in human lung epithelial cells.
J Biol Chem, 2002, **277**(36): 33153-33163.

PEDRAZZOLI P., BAINS M.A., WATSON R., FISHER J., HOY T.G. and JACOBS A.
c-myc and c-myb oncoproteins during induced maturation of myeloid and erythroid human leukemic cell lines.
Cancer Res, 1989, **49**(24 Pt 1): 6911-6916.

PENG H.L., ZHANG G.S., LIU J.H., GONG F.J. and LI R.J.
Dup-697, a specific COX-2 inhibitor, suppresses growth and induces apoptosis on K562 leukemia cells by cell-cycle arrest and caspase-8 activation.
Ann Hematol, 2008, **87**(2): 121-129.

PETTUS B.J., CHALFANT C.E. and HANNUN Y.A.
Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives.
Biochim Biophys Acta, 2002, **1585**(2-3): 114-125.

PEYERL F.W., DAI S., MURPHY G.A., CRAWFORD F., WHITE J., MARRACK P. and KAPPLER J.W.
Elucidation of some Bax conformational changes through crystallization of an antibody-peptide complex.
Cell Death Differ, 2007, **14**(3): 447-452.

PHILIP M., ROWLEY D.A. and SCHREIBER H.
Inflammation as a tumor promoter in cancer induction.
Semin Cancer Biol, 2004, **14**(6): 433-439.

PIKARSKY E., PORAT R.M., STEIN I., ABRAMOVITCH R., AMIT S., KASEM S., GUTKOVICH-PYEST E., URIELI-SHOVAL S., GALUN E. and BEN-NERIAH Y.
NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer.
Nature, 2004, **431**(7007): 461-466.

POLLYEA D.A., KOHRT H.E. and MEDEIROS B.C.
Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review.
Br J Haematol, 2011, **152**(5): 524-542.

PREISINGER C. and BARR F.A.
Kinases regulating Golgi apparatus structure and function.
Biochem Soc Symp, 2005, (72): 15-30.

PRENDERGAST G.C.
Mechanisms of apoptosis by c-Myc.
Oncogene, 1999, **18**(19): 2967-2987.

PROCHOWNIK E.V.
c-Myc as a therapeutic target in cancer.
Expert Rev Anticancer Ther, 2004, **4**(2): 289-302.

PUHLMANN U., ZIEMANN C., RUEDELL G., VORWERK H., SCHAEFER D., LANGEBRAKE C., SCHUERMANN P., CREUTZIG U. and REINHARDT D.
Impact of the cyclooxygenase system on doxorubicin-induced functional multidrug resistance 1 overexpression and doxorubicin sensitivity in acute myeloid leukemic HL-60 cells.
J Pharmacol Exp Ther, 2005, **312**(1): 346-354.

PULVERTAFT R.G.
Leprosy in Ethiopia.
Bull Hosp Joint Dis, 1974, **35**(1): 1-17.

PYRKO P., KARDOSH A. and SCHONTHAL A.H.
Celecoxib transiently inhibits cellular protein synthesis.
Biochem Pharmacol, 2008, **75**(2): 395-404.

RAMPINO N., YAMAMOTO H., IONOV Y., LI Y., SAWAI H., REED J.C. and PERUCHO M.
Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype.
Science, 1997, **275**(5302): 967-969.

REDDY S.T. and HERSCHMAN H.R.
Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages.
J Biol Chem, 1994, **269**(22): 15473-15480.

RISTIMAKI A.
Cyclooxygenase 2: from inflammation to carcinogenesis.
Novartis Found Symp, 2004, **256**: 215-221; discussion 221-216, 259-269.

RISTIMAKI A., SIVULA A., LUNDIN J., LUNDIN M., SALMINEN T., HAGLUND C., JOENSUU H. and ISOLA J.
Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer.
Cancer Res, 2002, **62**(3): 632-635.

ROSS S.E., RADOMSKA H.S., WU B., ZHANG P., WINNAY J.N., BAJNOK L., WRIGHT W.S., SCHAUFELE F., TENEN D.G. and MACDOUGALD O.A.
Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis.
Mol Cell Biol, 2004, **24**(2): 675-686.

RUVOLO P.P., DENG X. and MAY W.S.
Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis.
Leukemia, 2001, **15**(4): 515-522.

SALAH-ELDIN A.E., INOUE S., TSUKAMOTO S., AOI H. and TSUDA M.

An association of Bcl-2 phosphorylation and Bax localization with their functions after hyperthermia and paclitaxel treatment.
Int J Cancer, 2003, **103**(1): 53-60.

SARKAR F.H., ADSULE S., LI Y. and PADHYE S.
Back to the future: COX-2 inhibitors for chemoprevention and cancer therapy.
Mini Rev Med Chem, 2007, **7**(6): 599-608.

SCHLUTER C., DUCHROW M., WOHLENBERG C., BECKER M.H., KEY G., FLAD H.D. and GERDES J.
The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.
J Cell Biol, 1993, **123**(3): 513-522.

SCHMITT C.A.
Cellular senescence and cancer treatment.
Biochim Biophys Acta, 2007, **1775**(1): 5-20.

SCHNEIDER U., SCHWENK H.U. and BORNKAMM G.
Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.
Int J Cancer, 1977, **19**(5): 621-626.

SCHONTHAL A.H.
Antitumor properties of dimethyl-celecoxib, a derivative of celecoxib that does not inhibit cyclooxygenase-2: implications for glioma therapy.
Neurosurg Focus, 2006, **20**(4): E21.

SCHONTHAL A.H., CHEN T.C., HOFMAN F.M., LOUIE S.G. and PETASIS N.A.
Celecoxib analogs that lack COX-2 inhibitory function: preclinical development of novel anticancer drugs.
Expert Opin Investig Drugs, 2008, **17**(2): 197-208.

SCHUMACHER M., JUNCKER T., SCHNEKENBURGER M., GAASCHT F. and DIEDERICH M.
Natural compounds as inflammation inhibitors.
Genes Nutr, 2011, **6**(2): 89-92.

SEARS R.C.
The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation.
Cell Cycle, 2004, **3**(9): 1133-1137.

SECCHIERO P., BARBAROTTO E., GONELLI A., TIRIBELLI M., ZERBINATI C., CELEGHINI C., AGOSTINELLI C., PILERI S.A. and ZAULI G.
Potential pathogenetic implications of cyclooxygenase-2 overexpression in B chronic lymphoid leukemia cells.
Am J Pathol, 2005, **167**(6): 1599-1607.

SHAMAS-DIN A., BRAHMBHATT H., LEBER B. and ANDREWS D.W.

BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis.
Biochim Biophys Acta, 2011, **1813**(4): 508-520.

SHANMUGAM M.K., KANNAIYAN R. and SETHI G.
Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer.
Nutr Cancer, 2011, **63**(2): 161-173.

SHAPIRO G.I. and HARPER J.W.
Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control.
J Clin Invest, 1999, **104**(12): 1645-1653.

SHAROM F.J.
ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance.
Pharmacogenomics, 2008, **9**(1): 105-127.

SHE Q.B., SOLIT D.B., YE Q., O'REILLY K.E., LOBO J. and ROSEN N.
The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells.
Cancer Cell, 2005, **8**(4): 287-297.

SHENG H., SHAO J., KIRKLAND S.C., ISAKSON P., COFFEY R.J., MORROW J., BEAUCHAMP R.D. and DUBOIS R.N.
Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2.
J Clin Invest, 1997, **99**(9): 2254-2259.

SHENG H., SHAO J., MORROW J.D., BEAUCHAMP R.D. and DUBOIS R.N.
Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells.
Cancer Res, 1998, **58**(2): 362-366.

SHITASHIGE M., TOI M., YANO T., SHIBATA M., MATSUO Y. and SHIBASAKI F.
Dissociation of Bax from a Bcl-2/Bax heterodimer triggered by phosphorylation of serine 70 of Bcl-2.
J Biochem, 2001, **130**(6): 741-748.

SIDERIS E.G., TSOLOMYTY A., PIALOGLOU P., VITSA E. and CHARALAMBOUS S.
A simplified procedure for the observation in situ of chromosome aberrations or sister chromatid exchanges and the estimation of the mitotic index in mammalian monolayer cell cultures.
Stain Technol, 1984, **59**(4): 187-192.

SIEGEL M.R. and SISLER H.D.
Inhibition of Protein Synthesis in Vitro by Cycloheximide.
Nature, 1963, **200**: 675-676.

SIMMONS D.L., TAN S., TENEN D.G., NICHOLSON-WELLER A. and SEED B.
Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein.
Blood, 1989, **73**(1): 284-289.

SINGH M. and SINGH N.
Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells.
Mol Cell Biochem, 2009, **325**(1-2): 107-119.

SLUSS H.K. and DAVIS R.J.
H2AX is a target of the JNK signaling pathway that is required for apoptotic DNA fragmentation.
Mol Cell, 2006, **23**(2): 152-153.

SMITH S.M., ANASTASI J., COHEN K.S. and GODLEY L.A.
The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma.
Blood Cells Mol Dis, 2010, **45**(4): 317-323.

SMITH W.L., DEWITT D.L. and GARAVITO R.M.
Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology.
Annu Rev Biochem, 2000, **69**: 145-182.

SOBOLEWSKI C., CERELLA C., DICATO M., GHIBELLI L. and DIEDERICH M.
The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies.
Int J Cell Biol, 2010, **2010**: 215158.

SONG J., QU Z., GUO X., ZHAO Q., ZHAO X., GAO L., SUN K., SHEN F., WU M. and WEI L.
Hypoxia-induced autophagy contributes to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells.
Autophagy, 2009, **5**(8): 1131-1144.

SPENCER A.G., THURESSON E., OTTO J.C., SONG I., SMITH T., DEWITT D.L., GARAVITO R.M. and SMITH W.L.
The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. Peptide mapping and mutational analysis.
J Biol Chem, 1999, **274**(46): 32936-32942.

STALLER P., PEUKERT K., KIERMAIER A., SEOANE J., LUKAS J., KARSUNKY H., MOROY T., BARTEK J., MASSAGUE J., HANEL F. and EILERS M.
Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1.
Nat Cell Biol, 2001, **3**(4): 392-399.

STEFFEL J., LUSCHER T.F., RUSCHITZKA F. and TANNER F.C.
Cyclooxygenase-2 inhibition and coagulation.
J Cardiovasc Pharmacol, 2006, **47 Suppl 1**: S15-20.

STEINBACH D. and LEGRAND O.
ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra?
Leukemia, 2007, **21**(6): 1172-1176.

STEINBACH G., LYNCH P.M., PHILLIPS R.K., WALLACE M.H., HAWK E., GORDON G.B., WAKABAYASHI N., SAUNDERS B., SHEN Y., FUJIMURA T., SU L.K. and LEVIN B.

The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis.
N Engl J Med, 2000, **342**(26): 1946-1952.

STEWART Z.A., WESTFALL M.D. and PIETENPOL J.A.
Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy.
Trends Pharmacol Sci, 2003, **24**(3): 139-145.

STRILLACCI A., GRIFFONI C., SANSONE P., PATERINI P., PIAZZI G., LAZZARINI G., SPISNI E., PANTALEO M.A., BIASCO G. and TOMASI V.
MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells.
Exp Cell Res, 2009, **315**(8): 1439-1447.

STRILLACCI A., GRIFFONI C., SPISNI E., MANARA M.C. and TOMASI V.
RNA interference as a key to knockdown overexpressed cyclooxygenase-2 gene in tumour cells.
Br J Cancer, 2006, **94**(9): 1300-1310.

SUBHASHINI J., MAHIPAL S.V. and REDDANNA P.
Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro.
Cancer Lett, 2005, **224**(1): 31-43.

SUGANUMA M., OKABE S., MARINO M.W., SAKAI A., SUEOKA E. and FUJIKI H.
Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice.
Cancer Res, 1999, **59**(18): 4516-4518.

SUNDSTROM C. and NILSSON K.
Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937).
Int J Cancer, 1976, **17**(5): 565-577.

SURH Y.J.
Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals.
Nat Rev Cancer, 2003, **3**(10): 768-780.

TAKAHASHI A., MORI E., SU X., NAKAGAWA Y., OKAMOTO N., UEMURA H., KONDO N., NODA T., TOKI A., EJIMA Y., CHEN D.J., OHNISHI K. and OHNISHI T.
ATM is the predominant kinase involved in the phosphorylation of histone H2AX after heating.
J Radiat Res (Tokyo), **51**(4): 417-422.

TAKEUCHI K.
Prostaglandin EP receptors and their roles in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract.
Adv Clin Chem, **51**: 121-144.

TAKEUCHI K.
Prostaglandin EP receptors and their roles in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract.

Adv Clin Chem, 2010, **51**: 121-144.

TAMM I., WANG Y., SAUSVILLE E., SCUDIERO D.A., VIGNA N., OLTERSDORF T. and REED J.C.
IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs.
Cancer Res, 1998, **58**(23): 5315-5320.

TANI T., YLANNE J. and VIRTANEN I.
Expression of megakaryocytic and erythroid properties in human leukemic cells.
Exp Hematol, 1996, **24**(2): 158-168.

TE POELE R.H., OKOROKOV A.L., JARDINE L., CUMMINGS J. and JOEL S.P.
DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo.
Cancer Res, 2002, **62**(6): 1876-1883.

TEITEN M.H., GAASCHT F., CRONAUER M., HENRY E., DICATO M. and DIEDERICH M.
Anti-proliferative potential of curcumin in androgen-dependent prostate cancer cells occurs through modulation of the Wingless signaling pathway.
Int J Oncol, 2011, **38**(3): 603-611.

TESSNER T.G., MUHALE F., RIEHL T.E., ANANT S. and STENSON W.F.
Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation.
J Clin Invest, 2004, **114**(11): 1676-1685.

TESTA U.
TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies.
J Cell Biochem, 2010, **110**(1): 21-34.

THILL M., BECKER S., FISCHER D., CORDES T., HORNEMANN A., DIEDRICH K., SALEHIN D. and FRIEDRICH M.
Expression of prostaglandin metabolising enzymes COX-2 and 15-PGDH and VDR in human granulosa cells.
Anticancer Res, 2009, **29**(9): 3611-3618.

TOWNSEND D.M. and TEW K.D.
The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance.
Oncogene, 2003, **22**(47): 7369-7375.

TOYOTA M., SHEN L., OHE-TOYOTA M., HAMILTON S.R., SINICROPE F.A. and ISSA J.P.
Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors.
Cancer Res, 2000, **60**(15): 4044-4048.

TSAI D.E., LUGER S.M., KEMNER A., SWIDER C., GORADIA A., TOMCZAK E., DIPATRI D., BAGG A., NOWELL P., LOREN A.W., PERL A., SCHUSTER S., THOMPSON J.E., PORTER D., ANDREADIS C., STADTMAUER E.A., GOLDSTEINI S., GHALIE R. and CARROLL M.

Evidence of myeloid differentiation in non-M3 acute myeloid leukemia treated with the retinoid X receptor agonist bexarotene.
Cancer Biol Ther, 2007, **6**(1): 18-21.

TSATSANIS C., ANDROULIDAKI A., VENIHAKI M. and MARGIORIS A.N.
Signalling networks regulating cyclooxygenase-2.
Int J Biochem Cell Biol, 2006, **38**(10): 1654-1661.

VAKKILA J. and LOTZE M.T.
Inflammation and necrosis promote tumour growth.
Nat Rev Immunol, 2004, **4**(8): 641-648.

VAN DEN HEUVEL S.
Cell-cycle regulation.
WormBook, 2005: 1-16.

VAN STAA T.P., SMEETH L., PERSSON I., PARKINSON J. and LEUFKENS H.G.
What is the harm-benefit ratio of Cox-2 inhibitors?
Int J Epidemiol, 2008, **37**(2): 405-413.

VARTANIAN R., MASRI J., MARTIN J., CLONINGER C., HOLMES B., ARTINIAN N., FUNK A., RUEGG T. and GERA J.
AP-1 regulates cyclin D1 and c-MYC transcription in an AKT-dependent manner in response to mTOR inhibition: role of AIP4/Itch-mediated JUNB degradation.
Mol Cancer Res, 2011, **9**(1): 115-130.

VEYRUNE J.L., HESKETH J. and BLANCHARD J.M.
3' untranslated regions of c-myc and c-fos mRNAs: multifunctional elements regulating mRNA translation, degradation and subcellular localization.
Prog Mol Subcell Biol, 1997, **18**: 35-63.

VITALE I., GALLUZZI L., CASTEDO M. and KROEMER G.
Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability.
Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, **12**(6): 385-392.

WANG W., BERGH A. and DAMBER J.E.
Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostate cancer.
Clin Cancer Res, 2005, **11**(9): 3250-3256.

WANG X., GOCEK E., NOVIK V., HARRISON J.S., DANILENKO M. and STUDZINSKI G.P.
Inhibition of Cot1/Tlp2 oncogene in AML cells reduces ERK5 activation and up-regulates p27Kip1 concomitant with enhancement of differentiation and cell cycle arrest induced by silibinin and 1,25-dihydroxyvitamin D(3).
Cell Cycle, 2010, **9**(22): 4542-4551.

WANG Z., CAO L., KANG R., YANG M., LIU L., ZHAO Y., YU Y., XIE M., YIN X., LIVESEY K.M. and TANG D.

Autophagy regulates myeloid cell differentiation by p62/SQSTM1-mediated degradation of PML-RARalpha oncoprotein.
Autophagy, 2011, **7**(4): 401-411.

WEI Y., SINHA S. and LEVINE B.
Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation.
Autophagy, 2008, **4**(7): 949-951.

WHITE W.B., FAICH G., WHELTON A., MAURATH C., RIDGE N.J., VERBURG K.M., GEIS G.S. and LEFKOWITH J.B.
Comparison of thromboembolic events in patients treated with celecoxib, a cyclooxygenase-2 specific inhibitor, versus ibuprofen or diclofenac.
Am J Cardiol, 2002, **89**(4): 425-430.

WIEZOREK J., HOLLAND P. and GRAVES J.
Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer.
Clin Cancer Res, 2010, **16**(6): 1701-1708.

WIKMAN H. and KETTUNEN E.
Regulation of the G1/S phase of the cell cycle and alterations in the RB pathway in human lung cancer.
Expert Rev Anticancer Ther, 2006, **6**(4): 515-530.

WOESSMANN W. and MIVECHI N.F.
Role of ERK activation in growth and erythroid differentiation of K562 cells.
Exp Cell Res, 2001, **264**(2): 193-200.

WOLANIN K., MAGALSKA A., MOSIENIAK G., KLINGER R., MCKENNA S., VEJDA S., SIKORA E. and PIWOCKA K.
Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing cells.
Mol Cancer Res, 2006, **4**(7): 457-469.

WONG M.S. and VANHOUTTE P.M.
COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries.
Acta Pharmacol Sin, 2010, **31**(9): 1095-1102.

WONG T.S., MAN O.Y., TSANG C.M., TSAO S.W., TSANG R.K., CHAN J.Y., HO W.K., WEI W.I. and TO V.S.
MicroRNA let-7 suppresses nasopharyngeal carcinoma cells proliferation through downregulating c-Myc expression.
J Cancer Res Clin Oncol, 2011, **137**(3): 415-422.

WUN T., MCKNIGHT H. and TUSCANO J.M.
Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma.
Leuk Res, 2004, **28**(2): 179-190.

XIA J.J., PEI L.B., ZHUANG J.P., JI Y., XU G.P., ZHANG Z.P., LI N. and YAN J.L.
Celecoxib inhibits beta-catenin-dependent survival of the human osteosarcoma MG-63 cell line.

J Int Med Res, 2010, **38**(4): 1294-1304.

XIN B., YOKOYAMA Y., SHIGETO T. and MIZUNUMA H.
Anti-tumor effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human ovarian cancers.
Pathol Oncol Res, 2007, **13**(4): 365-369.

XU X.F., XIE C.G., WANG X.P., LIU J., YU Y.C., HU H.L. and GUO C.Y.
Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo.
Tohoku J Exp Med, 2008, **215**(2): 149-157.

YAMAKI T., ENDOH K., MIYAHARA M., NAGAMINE I., THI THU HUONG N., SAKURAI H., POKORNY J. and YANO T.
Prostaglandin E2 activates Src signaling in lung adenocarcinoma cell via EP3.
Cancer Lett, 2004, **214**(1): 115-120.

YAMAMOTO K., ICHIJO H. and KORSMEYER S.J.
BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M.
Mol Cell Biol, 1999, **19**(12): 8469-8478.

YAMANAKA Y., SHIRAKI K., INOUE T., MIYASHITA K., FUKE H., YAMAGUCHI Y., YAMAMOTO N., ITO K., SUGIMOTO K. and NAKANO T.
COX-2 inhibitors sensitize human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis.
Int J Mol Med, 2006, **18**(1): 41-47.

YANG V.W., SHIELDS J.M., HAMILTON S.R., SPANNHAKE E.W., HUBBARD W.C., HYLIND L.M., ROBINSON C.R. and GIARDIELLO F.M.
Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis.
Cancer Res, 1998, **58**(8): 1750-1753.

YANG W., SHEN J., WU M., ARSURA M., FITZGERALD M., SULDAN Z., KIM D.W., HOFMANN C.S., PIANETTI S., ROMIEU-MOUREZ R., FREEDMAN L.P. and SONENSHEIN G.E.
Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc.
Oncogene, 2001, **20**(14): 1688-1702.

YANO T., ZISSEL G., MULLER-QERNHEIM J., JAE SHIN S., SATOH H. and ICHIKAWA T.
Prostaglandin E2 reinforces the activation of Ras signal pathway in lung adenocarcinoma cells via EP3.
FEBS Lett, 2002, **518**(1-3): 154-158.

YAO M., LAM E.C., KELLY C.R., ZHOU W. and WOLFE M.M.
Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer.
Br J Cancer, 2004, **90**(3): 712-719.

YOUNG L.E., SANDUJA S., BEMIS-STANDOLI K., PENA E.A., PRICE R.L. and DIXON D.A.
The mRNA binding proteins HuR and tristetraprolin regulate cyclooxygenase 2 expression during colon carcinogenesis.
Gastroenterology, 2009, **136**(5): 1669-1679.

YU L., CHEN M., LI Z., WEN J., FU J., GUO D., JIANG Y., WU S., CHO C.H. and LIU S.
Celecoxib antagonizes the cytotoxicity of cisplatin in human esophageal squamous cell carcinoma cells by reducing intracellular cisplatin accumulation.
Mol Pharmacol, 2011, **79**(3): 608-617.

YU L., WU W.K., LI Z.J., LI H.T., WU Y.C. and CHO C.H.
Prostaglandin E(2) promotes cell proliferation via protein kinase C/extracellular signal regulated kinase pathway-dependent induction of c-Myc expression in human esophageal squamous cell carcinoma cells.
Int J Cancer, 2009, **125**(11): 2540-2546.

YURCHENKO M. and SIDORENKO S.P.
Hodgkin's lymphoma: the role of cell surface receptors in regulation of tumor cell fate.
Exp Oncol, 2010, **32**(4): 214-223.

ZAJAC-KAYE M.
Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer.
Lung Cancer, 2001, **34 Suppl 2**: S43-46.

ZENG L., AN S. and GOETZL E.J.
Independent down-regulation of EP2 and EP3 subtypes of the prostaglandin E2 receptors on U937 human monocytic cells.
Immunology, 1995, **86**(4): 620-628.

ZHANG G.S., LIU D.S., DAI C.W. and LI R.J.
Antitumor effects of celecoxib on K562 leukemia cells are mediated by cell-cycle arrest, caspase-3 activation, and downregulation of Cox-2 expression and are synergistic with hydroxyurea or imatinib.
Am J Hematol, 2006, **81**(4): 242-255.

ZHOU L. and CHANG D.C.
Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis.
J Cell Sci, 2008, **121**(Pt 13): 2186-2196.

ZRIEKI A., FARINOTTI R. and BUYSE M.
Cyclooxygenase inhibitors down regulate P-glycoprotein in human colorectal Caco-2 cell line.
Pharm Res, 2008, **25**(9): 1991-2001.

ZUBIAURRE L. and BUJANDA FERNANDEZ DE PIEROLA L.
[Aspirin in the prevention of colorectal cancer.].
Gastroenterol Hepatol, 2011, **34**(5): 337-345.

Cell Cycle 10:17, 2978-2993; September 1, 2011; © 2011 Landes Bioscience

Cox-2 inhibitors induce early c-Myc downregulation and lead to expression of differentiation markers in leukemia cells

Cyril Sobolewski,[1] Claudia Cerella,[1] Mario Dicato[2] and Marc Diederich[1,*]

[1]Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer; Hôpital Kirchberg; [2]Centre Hospitalier; Luxembourg City, Luxembourg

Key words: COX-2 inhibitors, c-Myc, cell proliferation, cell differentiation, myeloid markers

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; C/EBPα, CCAAT/enhancer binding protein α; COX, cyclooxygenase; Coxib, celecoxib; Cdk, cyclin dependent kinase; CHX, cycloheximide; CML, chronic myelogenous leukemia; ERK, extracellular signal-regulated kinase; Nime, nimesulide; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PGE2, prostaglandin E2; $p38^{MAPK}$, p38 mitogen-activated protein kinase; pRb, retinoblastoma protein; 3'UTR, 3'-untranslated region

It is well described that cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors counteract cancer cell proliferation by preventing the G_1/S transition. This effect has been associated with the inhibition of COX-2 enzymatic activity but also as an off-target effect essentially in adherent cancer cell models. In this study, we investigated the effect of three COX-2 inhibitors (nimesulide, NS-398 and celecoxib) on cell proliferation of leukemic and lymphoblastic cells expressing COX-2 at high (U937, Jurkat, Hel and Raji) and very low (K562) protein levels. We found that the inhibitors reduce cell proliferation in all COX-2-expressing cells leading to an accumulation in the G_0/G_1 phase of the cell cycle. We provide evidence that this modulation corresponds to an accumulation of cells in G_0 paralleled by the expression of cell differentiation markers in U937 (CD15) and Hel (CD41a and CD61) cells but not in the insensitive K562. These events are associated with a rapid downregulation (within one hour) of c-Myc expression, accompanied by the upregulation of p27 and the downregulation of PCNA and cyclin D1. Our study suggests c-Myc as a crucial early target of COX-2 inhibitors.

Do not distribute.

Introduction

The cell cycle is a highly regulated process involving various steps orchestrated by many modulator proteins that are triggered according to a precise chronology. Any perturbation of the cell cycle, if unresolved, may be followed by the activation of specific cell defense responses, such as apoptosis.[1] Alternatively, cells may react by activating a senescence program.[2] Both events have a protective effect for the entire body and represent a mechanism to limit the proliferation of potentially damaged cells.[3-6] These events may therefore serve as a barrier against the development of pathological conditions such as cancer.[2]

Carcinogenesis is characterized at its earliest steps by the loss of important cell cycle checkpoints, as a consequence of mutations in genes involved in cell cycle modulation, such as p53 and c-Myc.[7] These aberrations lead to uncontrolled and exacerbated cell proliferation, accompanied by the establishment of an undifferentiated state[7-9] and by the impairment of the ability of mutated cells to activate cell death.[10] These events then promote the progression toward the final malignant steps of cancer.

In a number of cases, dysfunction of the cell cycle in cancer cells is due alterations in G_1/S transition[7,11] and consequently, targeting pathological pathways implicated in G_1 and S phase progression may represent an important strategy for anti-cancer therapies.

c-Myc is one of the most commonly upregulated oncogenes in cancer.[12] This transcription factor plays an important role in cell cycle, as well as in apoptosis, cell differentiation, cell adhesion, metabolism and senescence.[9,13,14] It promotes the progression of cells from G_0/G_1 into S phase by regulating the transcription of different genes implicated in the G_1/S phase transition. It directly promotes cyclin D1 expression.[15] Cyclin D1 activates kinases, such as Cdk2 and Cdk4, that control the phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb).[16] Once phosphorylated, Rb triggers a cascade of events that starts with its release from the E2F transcription factor and culminates in the indirect transcriptional activation of additional cell cycle mediators that operate at the G_1/S transition, such as cyclin E and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA).[17]

c-Myc also binds to the promoter and represses the expression of the cell cycle inhibitor p27, a cyclin-dependent kinase inhibitor belonging to the Cip/Kip family, which blocks the entry of cells into S phase via inhibition of the cyclin-dependent kinases Cdk2, Cdk4 and Cdk6 and promotes the arrest of the cells in G_0 phase.[7,18]

*Correspondence to: Marc Diederich; Email: marc.diederich@lbmcc.lu
Submitted: 05/10/11; Revised: 07/02/11; Accepted: 07/05/11
DOI: 10.4161/cc.10.17.16460

Targeting c-Myc overexpression in cancer, therefore, plays a cytostatic role in cancer cells, precisely working at the G_1/S transition. Moreover, c-Myc plays an important role in differentiation of many cell types, including hematopoietic cells, where c-Myc downregulation is a pre-requisite to induce pro-differentiated states in cancer cells.[9]

Cyclooxygenases (COX) are a family of enzymes that catalyze the biosynthesis of prostaglandin from arachidonic acid. The two main isoforms, COX-1 and COX-2, have been intensively studied. COX-1, which is ubiquitously expressed, is implicated in tissue homeostasis[19] and seems to play a role in Alzheimer disease by favoring neuroinflammation.[20] The inducible form of COX, cyclooxygenase-2 (COX-2), is a major enzyme involved in inflammation and carcinogenesis.[19,21] Constitutive upregulation of COX-2 has been found in early pre-neoplastic stages of colon, prostate or breast tumors.[22] COX-2 overexpression has been linked to the promotion of cell proliferation in pre-malignant as well as malignant stages of cancer, increased angiogenesis, chemotherapeutic failure and pro-metastatic functions.[23] The importance of COX-2 in tumor promotion primarily comes from studies using inhibitors of COX-2 enzymatic activity, which represent the only therapeutic strategies to target COX-2 function. The prostaglandins produced by COX-2 enzyme activity have been frequently considered to be responsible for the stimulation of cell proliferation and the inhibition of apoptosis in different kinds of cancers.[21] Prostaglandins control the expression of several cell cycle genes through different signaling pathways regulated by prostanoid receptors.[24]

Targeting COX-2 has been reported to inhibit the proliferation of tumor cells. This cytostatic effect has been described for several solid tumors, where an arrest of the cells in G_0/G_1 has been frequently reported in reference 23. However, there is no consensus about the mechanisms responsible for these effects. More recently, COX-2 overexpression has also been described for hematological malignancies, where a role in carcinogenesis has not yet been elucidated.[25]

In this study, we investigated the effects of the COX-2 inhibitors nimesulide, NS-398 and celecoxib on cell proliferation in a panel of hematopoietic cancer cell lines. We show that all the three COX-2 inhibitors affected cell growth in different leukemic and lymphoblastic cell lines, including the acute myeloid leukemia cell lines (Hel and U937), Burkitt's lymphoma cell line (Raji) and acute lymphoid leukemic T cells (Jurkat) with the exception of the chronic myeloid cell line K562 which were insensitive. The mechanism of this regulation involved modulation of different cell cycle regulators with a specific timing, starting with a very early c-Myc downregulation and involving upregulation of p27 and downregulation of cyclin D1 and PCNA. Effects of COX-2 inhibitors culminated in the inhibition of G_1/S transition and accumulation of cells in G_0 phase of the cell cycle, which is associated with the expression of differentiation markers in the cell lines sensitive to COX-2 inhibitors.

Results

COX-2 inhibitors slow down cell proliferation of leukemic and lymphoblastic cell lines. Hel, Jurkat, K562, Raji and U937 cell lines were treated for up to 48 h with nimesulide (10, 40, 100 μM), NS-398 (10, 40, 100 μM) or celecoxib (10, 20, 30, 40 μM). The effect of the inhibitors on cell growth was then assessed. All three COX-2 inhibitors were able to inhibit cell growth in a dose-dependent manner in the panel of cell lines investigated with the exception of K562, which were mildly affected only at the highest concentrations (**Fig. 1A and Fig. S1**).

We confirmed that the impact of COX-2 inhibitors was on cell growth/proliferation rather than on cell viability. Up to one week of treatment with the different COX-2 inhibitors showed no accumulation of cells with apoptotic or necrotic nuclear features (**Fig. S2A and B**; U937 cells were chosen here as a representative cell line).[26] These results were confirmed by WB analysis of caspase-3 cleavage (**Fig. S2C**). Next, we monitored cell proliferation with the carboxyfluorescein succimidyl ester (CFSE) cell tracker (see Materials and Methods). **Figure 1B** shows a typical shift of CFSE fluorescence intensity, as determined by FACS analysis in untreated U937 and K562 cells after up to 48 h of cell culturing. The treatment with nimesulide and celecoxib prevented the reduction in CFSE fluorescence in a dose-dependent manner in U937 treated cells; conversely, K562 cells generally maintained the same pattern of CFSE fluorescence as observed for the untreated cells (**Fig. 1B**). Together, these data confirm that COX-2 inhibitors affect cell proliferation in hematopoietic cell lines.

COX-2 inhibitors counteract cell cycle progression by affecting the G_1/S transition. We next determined whether COX-2 inhibitors affected cell cycle progression. For further mechanistic studies, we selected U937 and K562 cells, which are the most sensitive and the least sensitive cell lines to COX-2 inhibitors, respectively. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry with propidium iodide (PI) staining. The analysis showed that all three COX-2 inhibitors led to an accumulation of U937 cells in G_0/G_1 phase (**Fig. 2A and B and Fig. S3A, C and D**). In K562 cells, COX-2 inhibitors did not induce any significant accumulation in any particular phase of the cell cycle (**Fig. 2B and Fig. S3B**). We verified that the modulation of the COX-2 inhibitors on cell cycle progression was common to the other selected sensitive cell lines (**Fig. S3C–E**).

The cell cycle is regulated by many factors and each phase is controlled by specific proteins whose levels of expression follow a specific timing.[7] We therefore analyzed the mRNA and protein levels of a panel of factors that specifically act during the G_1/S transition. In **Figure 2C and D**, we show that a group of these factors are differentially regulated in U937 vs. K562 cells, as assessed after 48 h of treatment with different concentrations of nimesulide. In treated U937 cells (**Fig. 2C**), the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 was upregulated at both the mRNA and protein levels; this change was accompanied by a downregulation of cyclin D1 and PCNA. No modulation of these factors was detected in the K562 cell line (**Fig. 2D**). The same analysis performed earlier, after only 24 h of treatment with nimesulide, revealed that the same cell cycle modulators already started to be affected (**Fig. S4A and B**). Moreover, NS-398 and celecoxib induced similar patterns of modulation at the level of mRNA (**Fig. S4C and D**). Altogether data suggest a modulation of p27,

©2011 Landes Bioscience. Do not distribute.

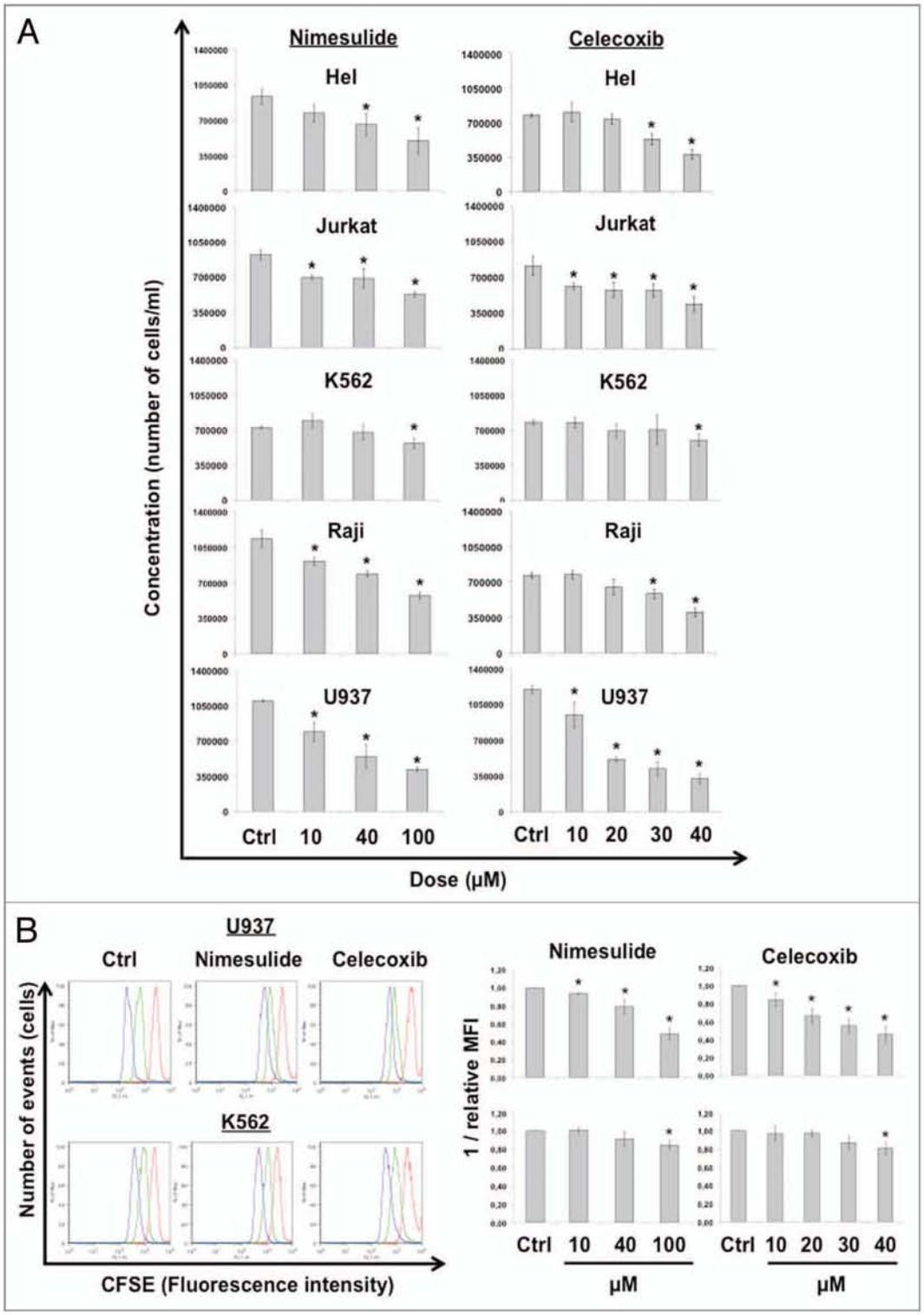


Figure 1. COX-2 inhibitors inhibit cell proliferation in the different cell lines. (A) Effect of nimesulide and celecoxib. Cells were seeded at time 0 at 2 x 10^5 cells/ml and then treated with the indicated concentration of nimesulide or celecoxib for up to 48 h. Cell proliferation was studied using the trypan blue exclusion assay. The experiment is representative of five independent experiments ± SD. (B) CFSE staining analysis to measure cell proliferation in U937 and K562 cells treated with nimesulide (10, 40, 100 μM) or celecoxib (10, 20, 30, 40 μM). Cells were stained with CFSE (0.1 μM), seeded at 2 x 10^5 cells/ml and then treated with the COX-2 inhibitors. CFSE fluorescence was measured after 0, 24 and 48 h by flow cytometry. Quantification of CFSE analysis after 48 h of treatment is represented (bottom parts). The fluorescence values were calculated as the ratio between the fluorescence estimated at 48 h and 0 h for each sample. The values obtained were further normalized with respect the value of the control (relative mean fluorescence intensity, MFI). As the fluorescence intensity is inversely proportional to the rate of proliferation of the cells, the quantification was represented as the inverse of relative MFI (1/relative MFI). The data are representative of four independent experiments (mean ± SD).

cyclin D1 and PCNA in U937 cells as part of the modulatory mechanism triggered by COX-2 inhibitors on cell cycle.

COX-2 inhibitors lead to an early downregulation of c-Myc protein. It is known that the oncogene c-Myc binds to the promoters of the p27 and cyclin D1 genes to transcriptionally regulate them in opposing ways. c-Myc represses p27 transcription[27] but promotes cyclin D1 expression.[15] We showed that COX-2 inhibitors upregulated p27 and downregulated cyclin D1; the modulation of this expression was also detectable at the mRNA level and was already apparent after 24 h of treatment (**Fig. 2C and Fig. S4C and D**). This similarity prompted us to investigate whether COX-2 inhibitors might affect c-Myc expression in our cell lines.

When U937 cells were incubated for 24 h with different concentrations of nimesulide, a dose-dependent reduction in the protein level of c-Myc was detectable (**Fig. 3A**). Celecoxib gave similar results (**Fig. S5A**). This effect was not limited to U937 cells, since c-Myc protein also appeared downregulated in the other cell lines sensitive to COX-2 inhibitors (**Fig. 3B**). Conversely, no significant changes were seen in K562 cells (**Fig. 3C and Fig. S5B**). A more stringent time-course analysis of c-Myc protein levels revealed that COX-2 inhibitors strongly impacted c-Myc expression already within the first hour of incubation (**Fig. 4A**).

The effect on c-Myc protein might be the result of increased protein instability and/or the modulation of earlier events in c-Myc gene expression, i.e., acting at the transcriptional or translational level. To differentiate between these two scenarios, we first analyzed the ability of COX-2 inhibitors to modulate c-Myc protein stability by using the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX).

©2011 Landes Bioscience. Do not distribute.

The reduction of c-Myc protein with CHX occurred within the timing of c-Myc downregulation that occurred upon treatment with nimesulide (**Fig. 4B**). When used in combination with CHX, nimesulide did not accelerate the disappearance of c-Myc protein (**Fig. 4C**). This excluded a direct modulatory role of COX-2 inhibitors on c-Myc protein stability and prompted us to determine the impact of COX-2 inhibitors on the upstream level of c-Myc expression.

We next investigated the potential of COX-2 inhibitors to affect c-Myc mRNA. As shown in **Figure 5**, we observed a significant reduction of c-Myc mRNA within 1 h of incubation with nimesulide (**Fig. 5A**). Since c-Myc mRNA possesses a 3'UTR region that can be targeted by specific factors that may affect its stability,[28] we determined whether COX-2 inhibitors may be implicated in this kind of modulation. **Figure 5B** shows no change in mRNA stability upon treatment with nimesulide or celecoxib, even at the highest drug doses. These results strongly suggest an affection of c-Myc transcription. c-Myc promoter activation may be controlled by several kinase-mediated pathways such as extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2),[29] and $p38^{MAPK}$.[30] We found that nimesulide very rapidly inhibited ERK1/2 phosphorylation with a similar extent to those observed using ERK inhibitor PD98059 (25 μM; 1 h of treatment; **Fig. 5C**) whereas p38 phosphorylation remained unaffected by the treatment (**Fig. S6**).

Altogether, these results indicate that the very early downregulation of c-Myc induced by COX-2 inhibitors is not dependent on a modulation of protein or mRNA stability and strongly suggests that this might be due to a regulation of transcriptional events controlling c-Myc expression where ERK-mediated pathways may be implicated.

Cyclooxygenase expression in leukemic and lymphoblastic cell lines. The modulation of cell proliferation and c-Myc expression by COX-2 inhibitors may be due to their specific ability to inhibit COX-2 enzymes or, alternatively, correspond to an off-target effect. To address the question, first we analyzed the level of expression of the two major COXs enzymes, COX-1 and COX-2 in our panel of hematopoietic cell lines at both the mRNA (by real-time PCR) and protein (by western blot analysis) levels (**Fig. 6**). COX-1 was expressed in all the cell types (**Fig. 6A**). For COX-2 (**Fig. 6B**), a similar trend of mRNA expression was observed. However, K562 cells express COX-2 protein at very low levels. These data show a correlation between COX-2 expression and the sensitivity of the cell lines to COX-2 inhibitors. The same analysis aimed at analyzing the level of expression of p53 or p73 (**Fig. S7A and B**), which are also implicated in cell cycle regulation,[31-33] did not show any correlation with the sensitivity to COX-2 inhibitors effect.

The biological properties of COX-2 enzymes are mainly due to prostaglandin E2 (PGE2),[21] which is well known to be involved in cell proliferation[34,35] and to transactivate ERK.[36] Therefore, we analyzed whether the effect of COX-2 inhibitors on c-Myc expression might be reversed by the exogenous administration of PGE2. To this purpose, U937 cells were pretreated with different concentrations of PGE2 before incubation with nimesulide. However, in presence of PGE2, nimesulide maintained its ability to induce c-Myc protein downregulation (**Fig. 6C**). These data suggest that, despite the good correlation between COX-2 expression and the sensitivity of the cell lines to COX-2 inhibitors, COX-2 inhibitors might affect c-Myc expression independently of PGE2 synthesis.

COX-2 inhibitors induce myeloid markers in sensitive acute myeloid leukemia cell lines. c-Myc expression is associated with the maintenance of cancer cells in an undifferentiated state. Consequently, its downregulation may promote accumulation of the cells in G_0 phase of cell cycle and cell differentiation.[9,37] The pattern of cellular alterations so far described as induced by COX-2 inhibitors may fit with the establishment of a more advanced pro-differentiated state. Therefore, we investigated any potential of COX-2 inhibitors to promote cell differentiation. We have shown that U937 and Hel are among the most sensitive cell lines to COX-2 inhibitors effects whereas K562 are practically unaffected. These cell lines are also eligible cell models to study an eventual induction of cell differentiation by COX-2 inhibitors. Because the promyeloid U937 cells have the potency to differentiate toward monocytes or granulocytes, we assessed a possible induction of myeloid differentiation in this cell line treated with nimesulide or celecoxib by analyzing the expression of the markers CD11b, CD14 which are more expressed in monocytes[38,39] and CD15 which is preferentially expressed in granulocytes[40,41] (**Fig. 7A and B**). From 10 μM of nimesulide and celecoxib, we witnessed a dose-dependent induction of CD15 already after 48 h of treatment whereas no increase of CD11b or CD14 might be

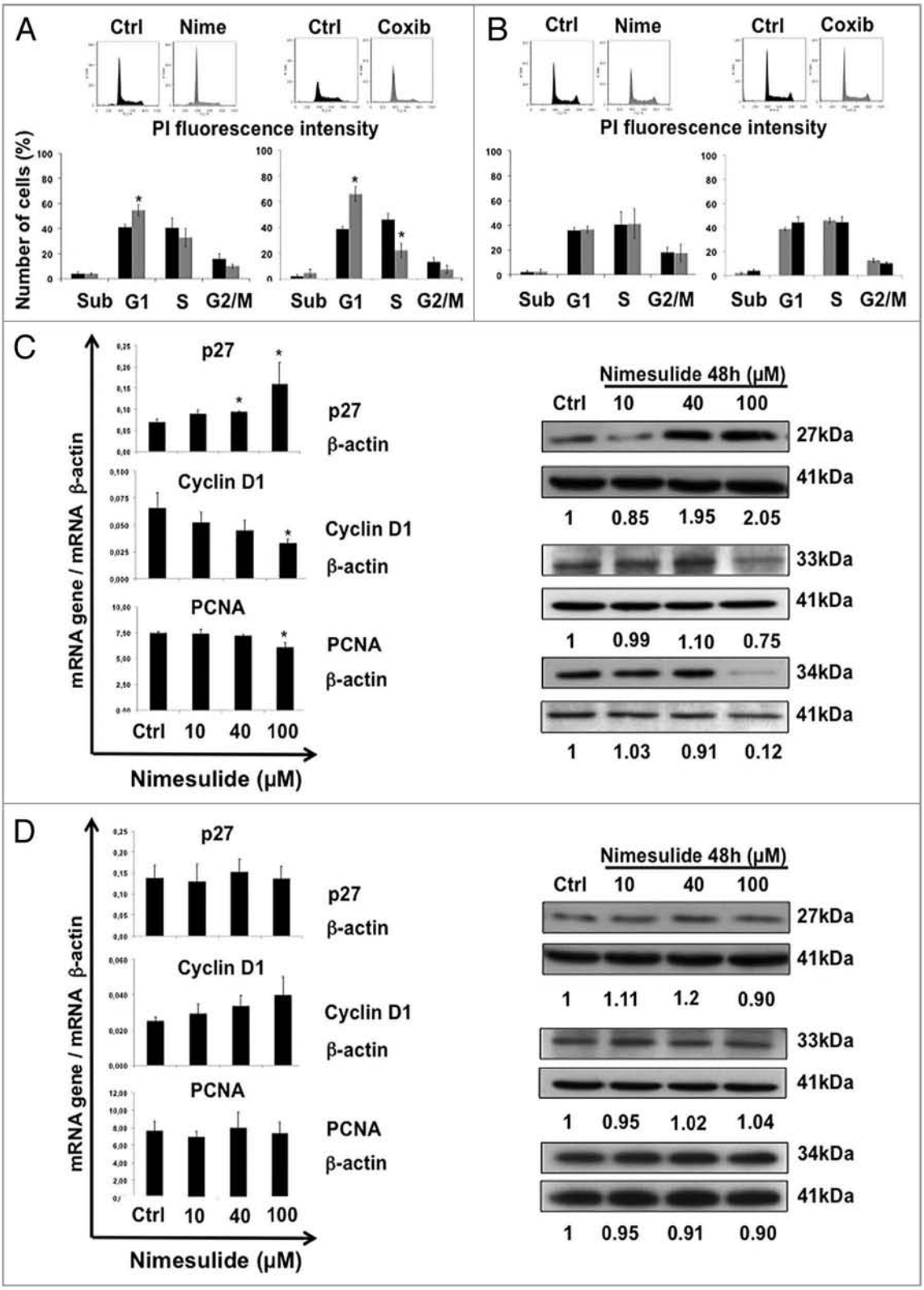


Figure 2. COX-2 inhibitors differentially affect G_1/S transition modulators in U937 and K562. Cell cycle analysis of U937 (A) or K562 (B) cells treated with nimesulide (100 μM) or celecoxib (40 μM) for 48 h. Cells were stained with propidium iodide (1 μg/ml) and cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. The data are representative of three independent experiments (mean ± SD). The level of cell cycle regulators (p27, cyclin D1 and PCNA) determined by real-time PCR analysis (left; mean of three independent experiments ± SD) and western blot (right; one of three independent experiments) in U937 (C) and K562 (D) cells treated for 48 h with nimesulide at the indicated concentrations. The data are representative of three independent experiments showing similar results.

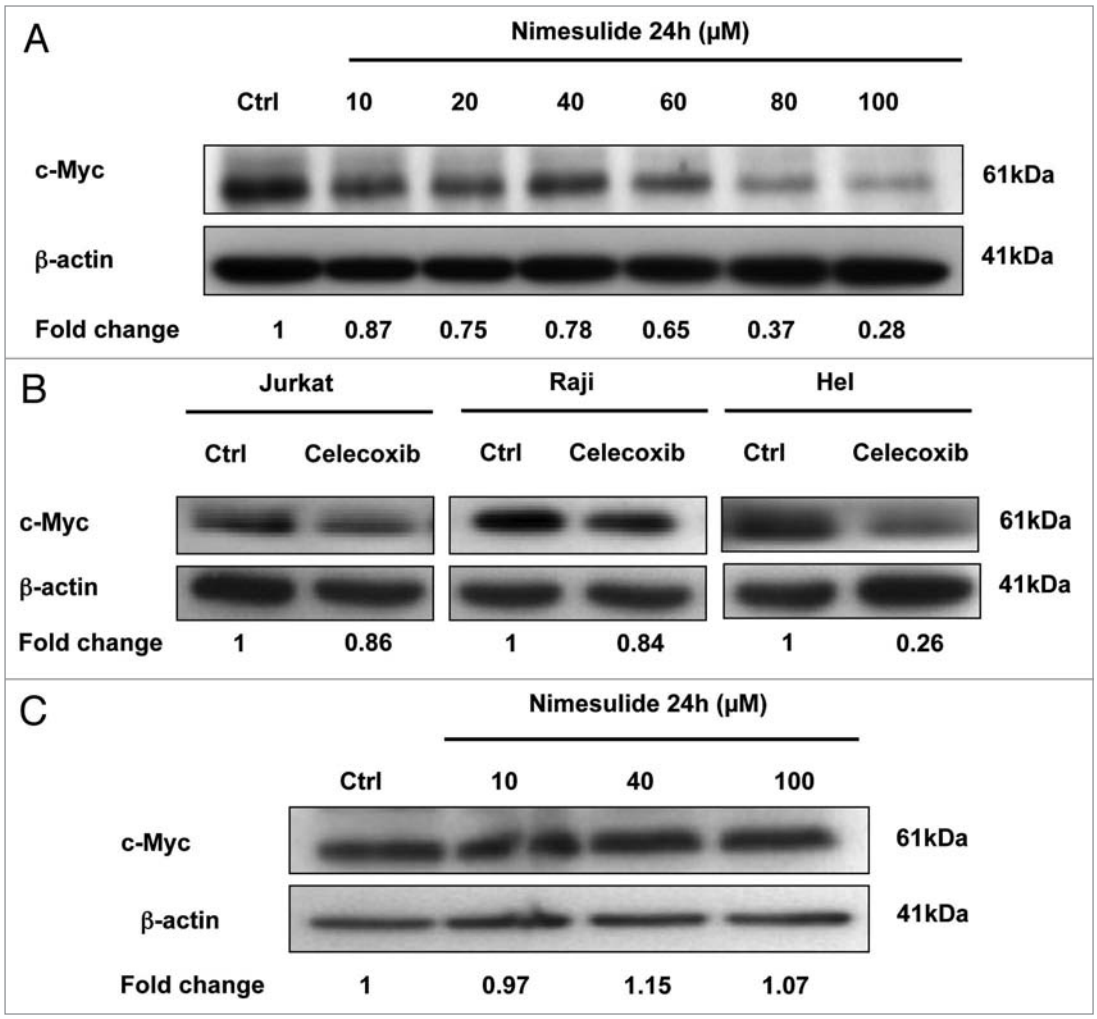


Figure 3. Nimesulide downregulates c-Myc in COX-2-positive cell lines. Effect of nimesulide (24 h of treatment) on c-Myc protein in: (A) U937 cells (0–100 μM); (B) the other COX-2 expressing cells, including Jurkat, Raji, Hel (100 μM); and (C) the COX-2-nonexpressing K562 cells (10, 40 or 100 μM). The data are representative of three independent experiments showing similar results.

detected even after longer times, i.e., 72 h, of treatment. Only celecoxib at the highest dose mildly inhibits CD11b expression. The expression of CD15 suggests the promotion by COX-2 inhibitors of a granulopoietic-like cell differentiation.

Cells committed to differentiation typically accumulated in G_0 phase of the cell cycle, the only phase during which the cells do not express the nuclear protein K_i-67.[42] **Figure 7C and D** reports the in situ analysis of K_i-67 protein expression by fluorescence microscopy and quantification by flow cytometer of untreated U937 cells compared with the ones treated with various concentrations of nimesulide and celecoxib. A significant dose-dependent increase in the percentage of K_i-67-negative cells might be appreciated, thus proving that a consistent fraction of U937 cells accumulate in G_0 phase of the cell cycle upon treatment. The pattern of alterations observed may be compatible with senescence or quiescence. The induction of senescence is accompanied by a strong increase of the size of the cells and a strong positivity to β-galactosidase staining.[43-45] Therefore, we performed a β-galactosidase assay on U937 cells treated with nimesulide or celecoxib (**Fig. S8**). In our positive control (K562 treated during 4 d with 100 nM of doxorubicin), we confirmed the expected pattern of alterations. In contrast, in U937 cells, COX-2 inhibitors did not lead to any relevant modifications.

We next verified any ability of COX-2 inhibitors to promote differentiation in Hel and K562 cells, which share the common property to differentiate in megakaryocytes or erythrocytes.[46] First, the expression of megakaryocytic markers, CD41a and CD61,[47] were investigated. In Hel, we witnessed a significant increase of both markers as early as 3 d of treatment (**Fig. 8A and B**). The same analysis performed at longer times (6 d of treatment) confirmed the same pattern of alterations, thus suggesting a megakaryocytic commitment (**Fig. 8A and B**). In K562 cells up to 6 d of treatment, no expression of CD41a and CD61 has been detected (**Fig. 8A**). Second, we verify the potential of K562 and Hel to differentiate in erythrocytes upon COX-2 inhibitors treatment by performing a benzidine assay (**Fig. 8C and D**). No positivity for Hel cells was detected up to 6 d of treatment. In K562 cells, the experiment revealed a slight increase of

benzidine-positive cells after 3 d of treatment only with nimesulide, which was not maintained at longer times of treatment (6 d), thus suggesting a mild and transient drug-specific effect (**Fig. 8D**). These data fit with the absence of c-Myc modulation in K562 cells upon COX-2 inhibitors treatment (**Fig. 3C**).

Altogether, these results suggest that COX-2 inhibitors lead to a pro-myeloid state of both acute myeloid cell lines, with a tendency to the granulocytic way for U937 cells and the megakaryocytic one for Hel.

Discussion

COX-2 inhibitors impair c-Myc expression. In the literature, an accumulation of cancer cells in G_0/G_1 has been reported to be a consequence of treatment with COX-2 inhibitors. In this context, meloxicam has been found to downregulate PCNA and cyclin A in a hepatocellular carcinoma cell line.[48] Similarly, in the MC-26 cell line, a highly invasive mouse colorectal cancer constitutively expressing COX-2,[49] NS-398 has been demonstrated to exert similar effects, including a reduction of cyclin D1 and PCNA, thus perturbing the G_1/S transition. Studies of hematopoietic cancers have shown an upregulation of p21 due to NS-398 and an accumulation of the cells in the G_0/G_1 phase of cell cycle.[50] However, no clear upstream events or regulators responsible for these patterns of cell cycle alterations have so far been identified.

The downregulation of cyclin D1 and the upregulation of p27 at the mRNA level led us to investigate a possible impact of COX-2 inhibitors on upstream transcription factors regulating the expression of these genes. One of these factors is the oncogene c-Myc, which is known to be a positive regulator of cyclin D1 transcription[15] and a repressor of p27.[27] Our study demonstrates that COX-2 inhibitors are able to downregulate c-Myc and to trigger this alteration very efficiently, even within one hour. Our findings exclude protein stability from being the step of c-Myc expression that is impaired by COX-2 inhibitors (**Fig. 5**). Our study therefore suggests that the early downregulation of c-Myc occurs via other mechanisms that operate upstream of protein synthesis. The quantification of c-Myc mRNA showed a significant reduction within one hour of treatment. c-Myc mRNA is known to possess a 3'-untranslated region (UTR) targeted by specific factors that may modulate its stability.[28] However, the stability of the mRNA remained statistically unchanged at each measured time-point, as assessed by our time-course analysis with the transcription inhibitor actinomycin D. This indicates that the transcriptional repression of c-Myc appears to occur quite rapidly after COX-2 administration. This does not exclude that an inhibition of translation may stably take place that accompanies transcriptional repression.

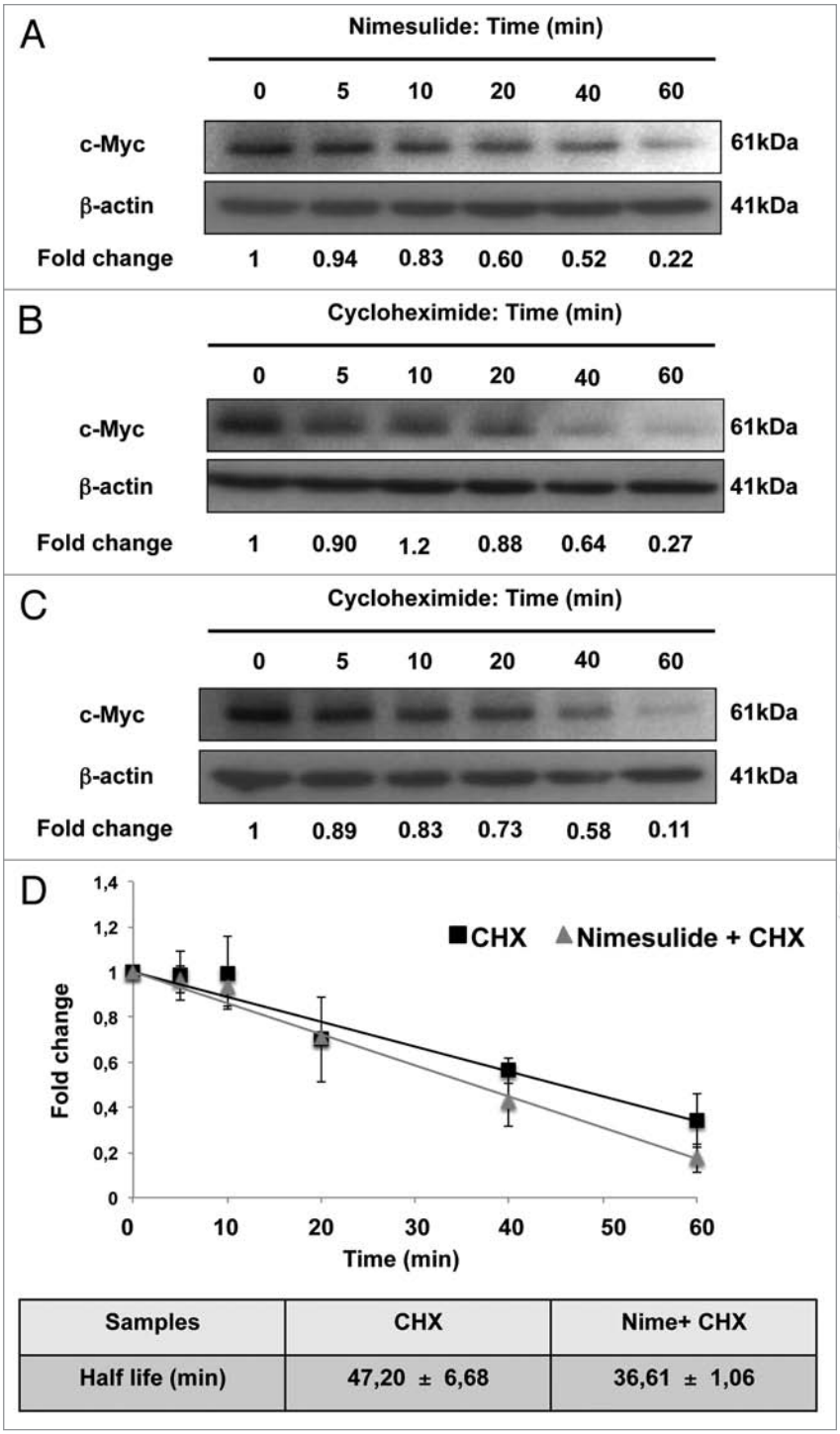
We confirmed in our cell systems that the inhibition of ERK phosphorylation with the specific inhibitor PD98059 downregulates c-Myc expression. Here, we highlight that nimesulide is able to inhibit ERK1/2 phosphorylation to a similar extent. This modulation precedes c-Myc protein downregulation (**Fig. 5C**). This strongly suggests that the COX-2 inhibitors may mediate an attenuation of ERK-mediated pathways, which, in turn, may be responsible for the inhibition of c-Myc transcription. Our finding also supports this hypothesis that c-Myc mRNA pool is early reduced without affecting mRNA stability. However, we cannot exclude that other transcriptional and translational mechanisms as well may be implicated. Published data described that celecoxib can inhibit $p38^{MAPK}$ in hepatocarcinoma.[51] However, in our study, no modulation of p38 phosphorylation has been observed, thus suggesting a cell type-dependent mechanism. Further studies are needed to identify all the mechanisms responsible for the patterns of c-Myc mRNA/protein alterations. We suggest some other potential molecular candidates to be investigated in the future. For example, Wnt/β-catenin is one of the intracellular signaling pathways that may control transcription factor binding to the c-Myc promoter. Interestingly, the Wnt/β-catenin pathway has been reported to be a target of COX-2 inhibitors.[52] mTOR is another kinase to be considered. Indeed, the mTOR pathway is also implicated in G_1/S transition by inhibiting p27 expression and by stimulating cyclin D1 expression.[53] Moreover, a link between c-Myc and mTOR has been already described in different cell models.[53-55]

In our study, a correlation between the constitutive expression of COX-2 and the effects of COX-2 inhibitors has emerged. The modulatory effect on cell cycle and differentiation triggered by COX-2 inhibitors was not observed in K562 cells, which we found very mildly expressing COX-2 protein. Moreover, the analysis of p53 and p73, which play also a role in cell cycle,[32,33,56] did not reveal any correlation with the sensitivity of hematopoietic cancer cell models to COX-2 inhibitors. These findings may suggest a COX-2-dependent effect. Celecoxib showed the strongest effect on cell proliferation, and this was correlated with the lower IC_{50} reported for this compound toward COX-2 (0.04 μM vs. 1.27 μM for nimesulide and 1.77 μM for NS-398).[57] In addition, similar results have been obtained with hematological malignant cell lines such as Raji, BjAB (Epstein-Barr virus negative cell line) and BL41 (Burkitt's lymphoma).[58] In these cell lines, celecoxib was also able to inhibit cell proliferation.[59] An ability of nabumetone and NS-398 to inhibit proliferation of the U937 and ML-1 cell lines and induce an accumulation of cells in the G_0/G_1 phase of cell cycle has been also described in reference 50. In the same study, the use of anti-sense RNA against COX-2 showed that this was at least in part a COX-2-dependent effect.[50]

In our study, the pre-treatment of U937 cells with PGE2, the upstream product of COX-2 enzyme activity, was unable to revert nimesulide-induced c-Myc downregulation (**Fig. 6C**). These results suggest that COX-2 inhibitors might act independently of PGE2 but the involvement of other prostaglandins should be considered. Indeed, other prostaglandins can promote a proliferative state of the cells.[23,60] Besides, the exacerbation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma-dependent pathways occurring downstream to arachidonic acid production affects cell proliferation and may promote cell differentiation.[61,62] Therefore, the involvement of pathways downstream to the COX-2 substrate arachidonic acid may be also conceivably implicated.

COX-2 inhibitors induce myeloid differentiation markers expression. Our study reveals an induction of specific differentiation markers in U937 cells (granulocytic CD15) and Hel

©2011 Landes Bioscience. Do not distribute.

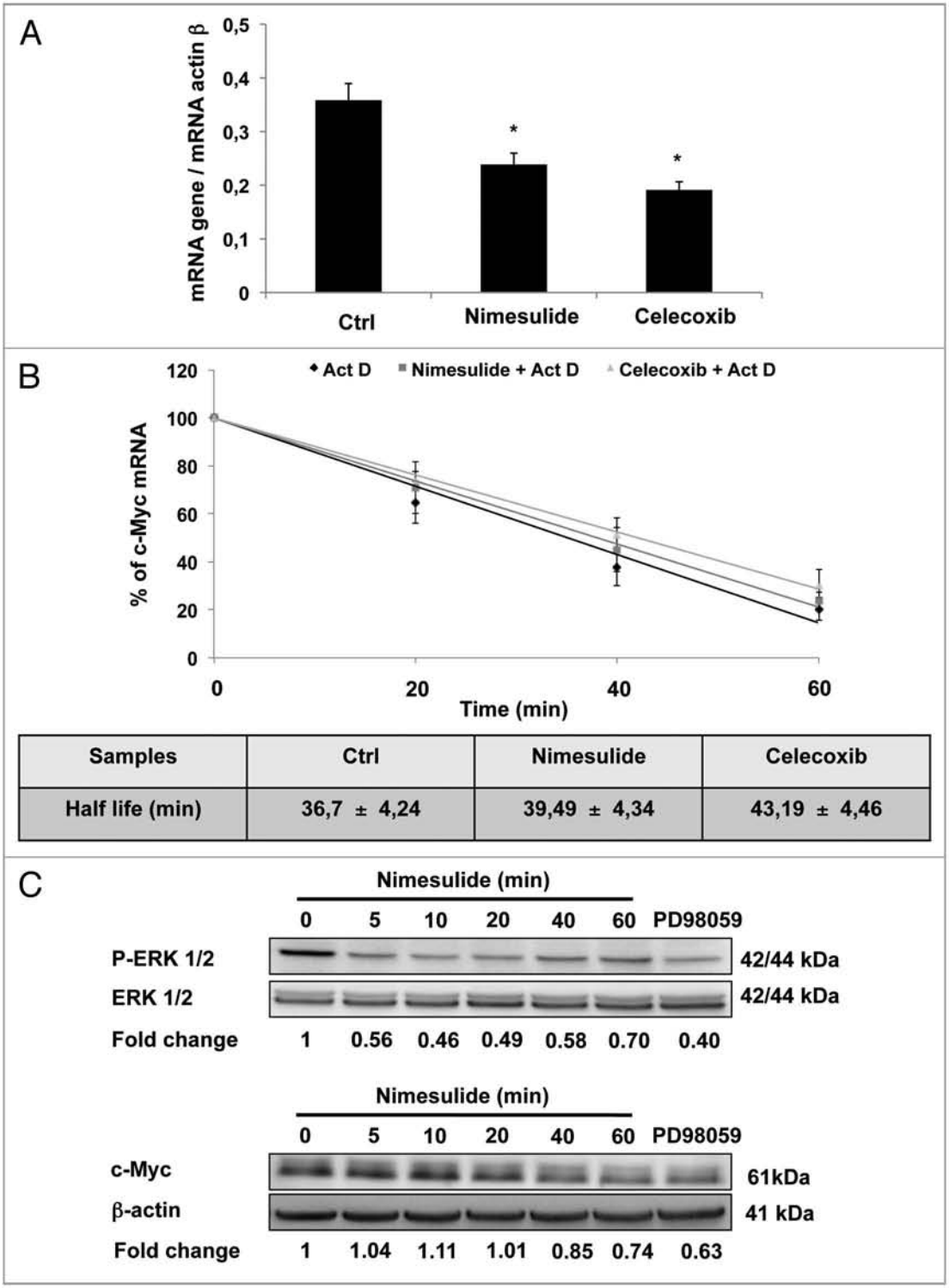


Samples	CHX	Nime+ CHX
Half life (min)	47,20 ± 6,68	36,61 ± 1,06

Figure 4. Effect of COX-2 inhibitors on c-Myc protein stability. Time course of c-Myc protein downregulation following incubation with nimesulide (100 μM) in U937 cells (A). The time-course analysis with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX), as determined in U937 cells: untreated (B), pre-treated for 1 h with (C) nimesulide (100 μM). The data are representative of three independent experiments showing similar results. (D) Quantification of the c-Myc downregulation time courses: (D) represents (B and C); (mean of three experiments ± SD). The corresponding half-life values ± SD are reported in the bottom part.

(megakaryocytic CD41a and CD61), both sensitive to the anti-proliferative effects of the COX-2 inhibitors. Remarkably, K562 cells, which are not affected in their proliferation by COX-2 inhibitors, do not express differentiation markers. U937 cells may also differentiate in monocytes, frequently associated with the upregulation of CD11b and CD14,[39] that we did not observed. In our study COX-2 inhibitors inhibit ERK1/2 phosphorylation and in literature, a causal link between ERK phosphorylation and the granulocytic differentiation of U937 cells has been described in reference 63. In this study, the importance of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBPα) has been underlined.[63] The phosphorylation of this protein on serine 21 by ERK is responsible for the inhibition of granulopoiesis. Moreover, it has been suggested that c-Myc represses C/EBPα transcription,[9] thus showing the importance of c-Myc in granulopoiesis. Moreover, c-Myc transcription is negatively regulated by C/EBPα.[64] We suggest this factor as a possible key element in our system to investigate in the future. c-Myc seems to play also a direct role in cell differentiation. Indeed, recently, a link between c-Myc and megakaryocytic commitment has been demonstrated in some studies showing an increase of megakaryocytic differentiation in mice c-Myc$^{-/-}$.[65]

Even if COX-2 inhibitors trigger the expression of differentiation markers, however, the sensitive cells never reach a state of terminal differentiation. The May-Grünwald/Giemsa staining performed in U937 cells cultivated up to one week with COX-2 inhibitors do not reveal any acquisition of the nuclear features expected in case of a more advanced granulopoietic differentiation (not shown). Besides, cell viability continues to be not affected (**Fig. S1**). Thus, COX-2 inhibitors seem to push the cells toward a more advanced differentiated state without allowing them to reach the terminal differentiation. In this instance, the cells may conceivably just cycle much slower. The analysis of the expression of the nuclear antigen K_i-67 suggests an interpretation. After mitosis, the cells may be entrapped for some periods in G_0 phase followed by their re-entering in G_1 and cell cycle progression. Interestingly, p27, which is a factor promoting the quiescence of mammalian cells[66] is upregulated by COX-2 inhibitors. Our findings seem to exclude an effect of COX-2 inhibitors on cellular senescence; typical alterations of senescence like hypertrophy and exacerbated β-galactosidase staining cannot be observed in U937 cells upon



Samples	Ctrl	Nimesulide	Celecoxib
Half life (min)	36,7 ± 4,24	39,49 ± 4,34	43,19 ± 4,46

Figure 5. Effects of COX-2 inhibitors on c-Myc mRNA. Quantification of c-Myc mRNA in U937 cells treated for 1 h with nimesulide (100 μM) or celecoxib (40 μM) (A) by Real-time PCR analysis. The expression of mRNA is represented as the ratio of c-Myc mRNA/β-actin mRNA. The data are the mean of three different experiments ± SD. Time-course analysis of c-Myc mRNA stability, studied by using the transcription inhibitor actinomycin D (ACTD; time 0). In U937 cells, untreated or pre-treated with nimesulide (100 μM) or celecoxib (40 μM) for 1 h (B). The corresponding half-life values ± SD are reported in the bottom part. The effect of nimesulide on ERK1/2 phosphorylation is shown in (C). As a negative control, the specific ERK inhibitor PD98059 was used (25 μM; 1 h). The data are the mean ± SD of three independent experiments.

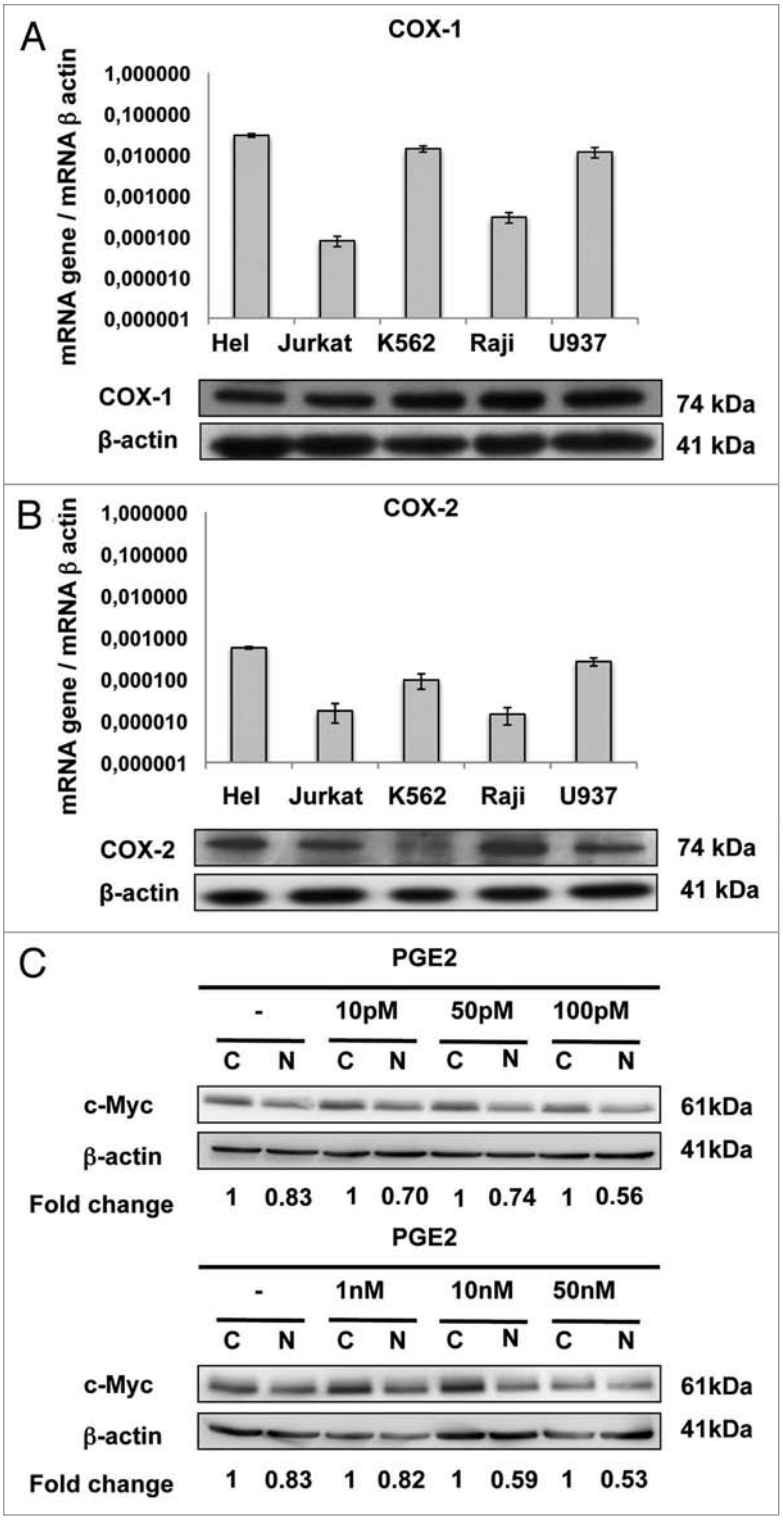


Figure 6. COX-1 and COX-2 expression in different hematopoietic cell lines. COX-1 (A) and COX-2 (B) expression at the level of mRNA (top), as determined by Real-time PCR analysis, and at the protein level (bottom), as determined by western blot analysis. β-actin (mRNA or protein) was used in both analyses as a reference. For mRNA quantification, the data are the means of three independent experiments ± SD. For western blot analysis, one of at least three independent experiments is shown. (C) The effect of PGE2 on nimesulide-induced c-Myc downregulation. U937 cells were incubated with the indicated concentrations of PGE2 for 1 h, then treated with nimesulide (100 μM) for 1 h. The expression of c-Myc was analyzed by western blot.

COX-2 inhibitor treatment. It has been suggested that the choice between quiescence and senescence depends on mTOR activation.[67,68] The inhibition of mTOR is frequently associated with quiescence and this inhibition can be driven by p53.[68] However, U937 cells do not express p53 and p73. Therefore, our data imply that the choice between quiescence/senescence should be p53-independent in U937 cells treated with COX-2 inhibitors.

In these latest years, an upsurge of interest concerns the ability of cancer cells to enter in a dormant state.[69] This condition can be interrupted even after years up to decades from the first diagnosis and successful treatment of cancer patients and is currently considered the main factor contributing to tumor relapse. A desirable condition is to find out therapeutic treatments that maintain these cells in dormancy. A comparison of the hallmarks described for cancer dormant cells to the pattern of alterations produced by COX-2 inhibitors reveals a number of similarities: the inhibition of cell proliferation and the enter in G_0 phase, and most-notably, c-Myc downregulation and the acquisition of a more differentiated state, by means of which the cells tend to behave like the normal counterpart.[70] Importantly, the re-activation of c-Myc protein expression is per se sufficient to reactivate the malignant phenotype.[71] We do not know yet what exactly maintains the cells so longer in dormancy. Conceivably, cells may cycle very much slower rather than completely stopping in G_0, to be maintained so long times. The fact that COX-2 inhibitors similarly trigger an early and stable downregulation c-Myc and affect cell proliferation may be thus an intriguing aspect to be further elucidated.

c-Myc is known to be overexpressed in many kinds of tumors, such as Burkitt's lymphomas and different leukemia,[72] where it contributes to their aggressiveness and poor prognosis. Thus, much effort is being placed on targeting this oncogene.[13,14] Our data identify a novel biological property of COX-2 inhibitors and suggests their possible use to target this oncoprotein. Moreover, it would be interesting to check a possible effect on other members of the MYC family such as MYCN, which is amplified in pediatric tumors of the nervous system.[73] Thus, investigating whether COX-2 inhibitors lead to similar effects in these tumors may have important clinical implications. Besides, the dysregulation of differentiation is frequently associated with acute myeloid leukemia. The use of pro-differentiating agents like retinoic acid, RXR agonist (i.e., bexarotene) or valproic acid, has already shown an ability to overcome this defect in leukemia[74] and is associated with a better prognosis. Similarly, 1,25-dihydroxyvitamin D_3 (1,25D) displays an ability to induce differentiation in leukemic cells.[75] However, the clinical use of this drug bears the risk of severe side effects, such as hyperkalemia.[76] Thus, efforts are being placed on a combination

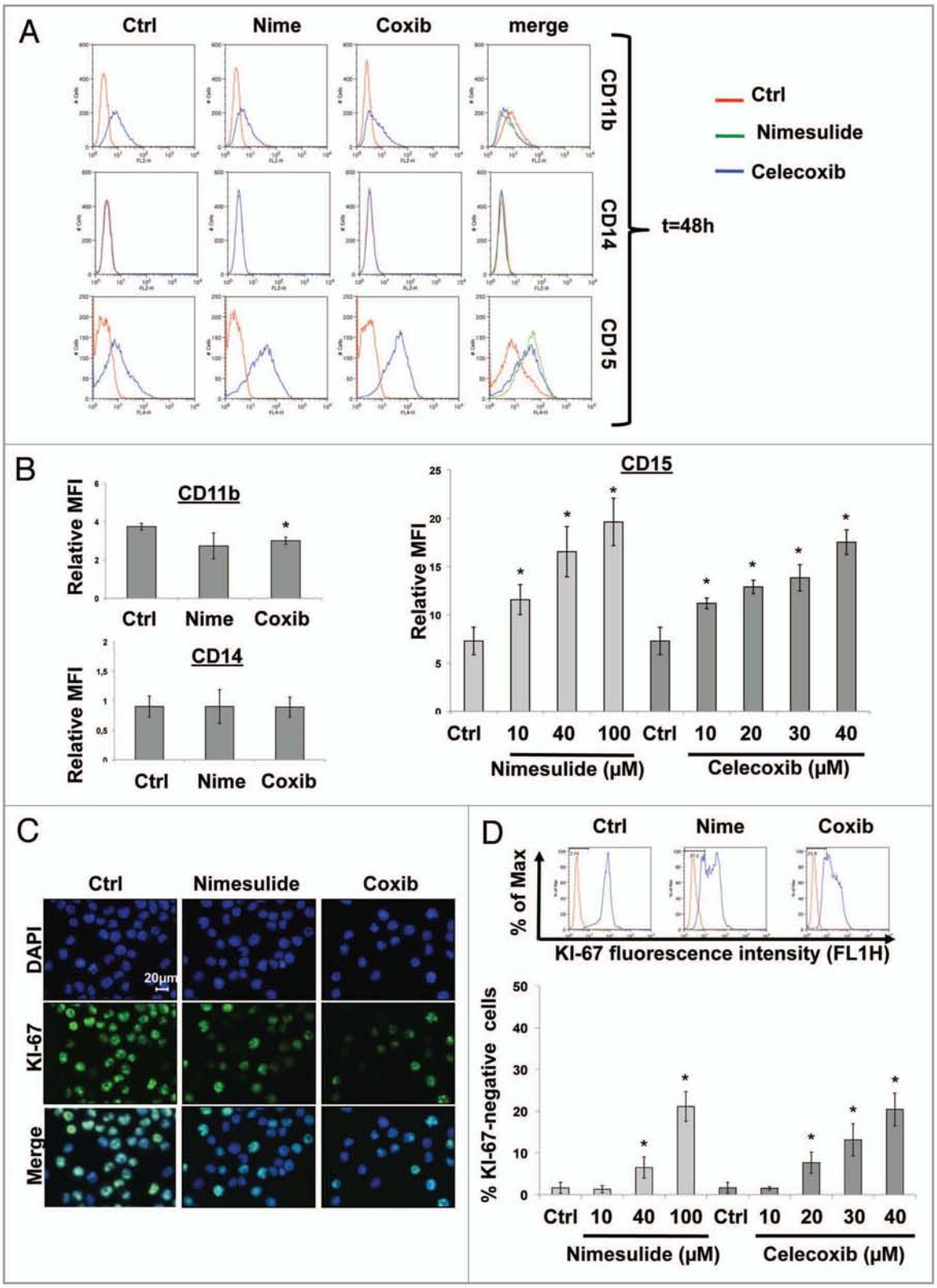


Figure 7. COX-2 inhibitors induce CD15 expression in U937, cells. Flow cytometric analysis of CD11b, CD14 and CD15 in U937 cells treated for 48 h with nimesulide or celecoxib (A and B). Analysis of K_i-67 protein expression by fluorescence microscopy (C) and flow cytometry (D) in U937 cells treated for 48 h with nimesulide or celecoxib.

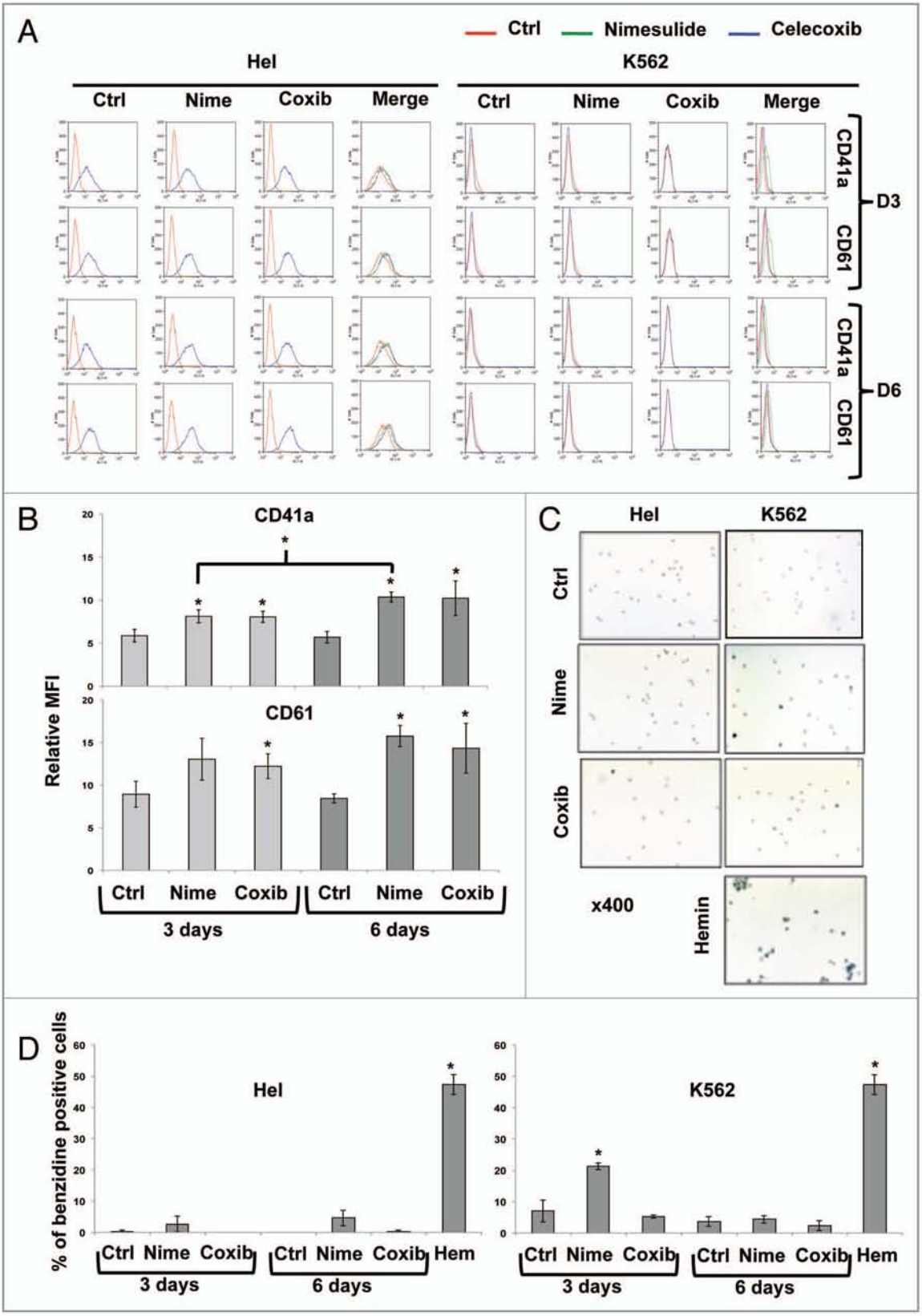


Figure 8. Differential effects of COX-2 inhibitors on megakaryocytic differentiation markers in Hel and K562 cells. (A) Flow cytometric analysis of CD41a and CD61 in Hel and K562 cells treated for 3 d and 6 d with nimesulide or celecoxib. The corresponding quantifications of CD41a and CD61 for Hel are represented in (B). (C and D) Benzidine staining of Hel and K562 cells after 3 and 6 d of treatment with COX-2 inhibitors. As a positive control, K562 cells were treated for 48 h with hemin (30 μM).

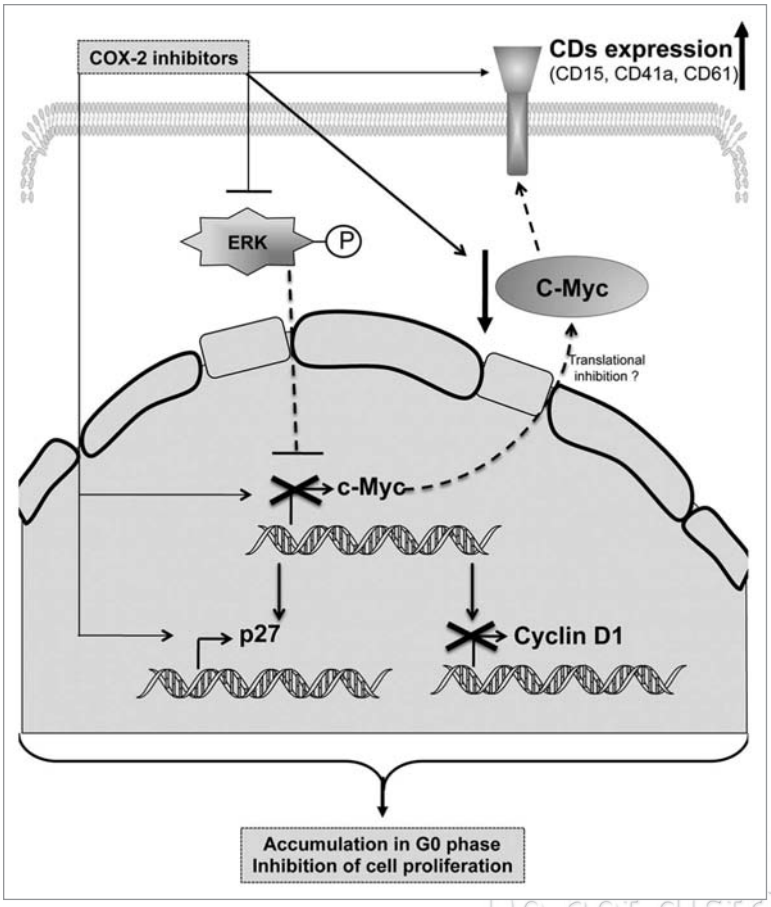


Figure 9. Action of COX-2 inhibitors on cell proliferation modulation of hematopoietic cancer cells: a model. COX-2 inhibitors early downregulate c-Myc. COX-2 inhibitors lead to a reduction of cyclin D1 and an upregulation of p27, which are, respectively, positively and negatively transcriptionally regulated by c-Myc. Consequently, the inhibition of G_1/S transition and accumulation of cells in G_0 phase take place. This is accompanied by the expression of cell differentiation markers and the reduction of cell proliferation. COX-2 inhibitors inhibit ERK1/2 phosphorylation, which may be implicated in c-Myc expression inhibition.

of lower concentrations of 1,25D with other drugs. In this context, an enhancement of 1,25D-induced differentiation has been obtained with NSAIDs (indomethacin) and COX-2 inhibitors (DUP-697).[75] In this study, this effect was associated with an enhancement of Raf1 phosphorylation and a decrease of ERK1/2 phosphorylation in HL-60 and U937 cells. Moreover, in another study the abrogation of Cot1 oncogene, associated to an inhibition of its downstream target ERK5, sensitizes AML cell models to 1,25D-induced differentiation.[77] Our study demonstrates an ability of COX-2 inhibitors to increase myeloid differentiation markers and to inhibit ERK1/2 phosphorylation, thus showing interesting similarities. Altogether, our data suggest a beneficial effect of these drugs in pro-differentiating therapy; besides, conceivably, COX-2 inhibitors might sensitize our cell models to differentiation inducers.

In summary, we have shown for the first time that COX-2 inhibitors inhibit c-Myc expression at very early times. The data are in favor of an early effect on transcription, where the early inhibition of ERK-mediated pathway may play a role. The subsequent upregulation of p27, together with the downregulation of cyclin D1 and PCNA, contributes to stop the cells in G_0 and impairs the G_1/S phase transition of the cell cycle. These events are associated with a more advanced differentiated state. **Figure 9** gives a hypothetical scheme of the molecular events implicated in the action of COX-2 inhibitors.

Materials and Methods

Cell culture and reagents. U937 (human histiocytic lymphoma), Jurkat (acute lymphoid leukemic T cells), K562 (chronic myeloid leukemia), Raji (Burkitt's lymphoma) and Hel (human megakaryocytic acute myeloid leukemia) cells (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ) were cultured in RPMI 1640 medium (Bio-Whittaker) containing 10% (v/v) fetal calf serum (FCS; Lonza, Verviers, Belgium), 1% (v/v) antibiotic-antimycotic solution (Lonza) and 2 mM L-glutamine (Lonza) at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. The experiments were performed on cells in the logarithmic phase of growth and in culture medium containing 10% FCS. Nimesulide and NS-398 were purchased from Cayman Chemicals. Celecoxib was purchased from Merck. SB203580 (inhibitor of $p38^{MAPK}$) and PD98059 (inhibitor of ERK1/2) were purchased from Promega.

©2011 Landes Bioscience. Do not distribute.

Cell viability assays. Cell viability assays were performed by using the Trypan blue exclusion assay. The fraction of Trypan blue-positive cells was estimated by using a Malassez chamber and confirmed by using the cell counter Cedex (Innovatis AG).

Evaluation of apoptosis. The percentage of apoptotic cells was quantified as the fraction of cells showing apoptotic, fragmented nuclei[78] as assessed by counting at least 100 cells in at least three random fields by fluorescence microscopy (Leica-DM IRB microscope) after staining with the DNA-specific dye Hoechst 33342 (Sigma). Alternatively, cleavage of caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology) was assessed by western blot (WB) analysis. Etoposide (VP16; 100 μM for 5 h in U937 cells) was used as a positive control.

Immunofluorescence analysis. *Carboxyfluorescein succimidyl ester (CFSE) cell tracker assay.* CFSE cell tracker assay was performed according to the manufacturer's instructions (Sigma). Briefly, cells were washed twice in PBS and then resuspended (1 x 10^6 cells/ml) in a solution of PBS containing 0.2 μM CFSE for 10 min at 37°C. After two washes in PBS, cell were resuspended in culture medium (2 x 10^5 cells/ml). The fluorescence intensity was measured by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson Biosciences) at 0, 24 and 48 h after the treatment with the COX-2 inhibitors. Data were recorded (10,000 events/sample) using the CellQuest software (http://www.bdbiosciences.com/features/products/display_product.php?keyID = 92) and further analyzed with FlowJo 8.8.5 software (Tree Star Inc.).

Cell cycle analysis. Cell cycle distribution was analyzed according to standard procedures based on DNA staining with

propidium iodide (1 μg/ml, Sigma-Aldrich) and RNase A (100 μg/ml; Roche) in PBS before analysis by FACS. Events were recorded statistically (10,000 events/sample) using the CellQuest software. Data were further analyzed by using Flow-Jo 8.8.5 software.

Analysis of cell differentiation markers expression. Cell differentiation was analyzed by quantification of cell surface makers. 1 x 10^6 cells were washed twice with PBS and then incubated during 1 h with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibodies against CD11b, CD14 and APC-conjugated antibody against CD15 for the myeloid differentiation. For the megakaryocytic markers, FITC-conjugated antibodies against CD41a (BD Biosciences) and CD61 (DAKO) were used. Isotype immunoglobulins (BD Biosciences) were used as negative controls. Finally, cells were washed twice in PBS and analyzed by flow cytometry. Erythroid differentiation was monitored by benzidine staining as previously described in reference 79.

K_i-67 nuclear antigen expression. U937 cells were fixed, permeabilized and immunostained with an antibody against K_i-67 (BD Biosciences) during 1 h at room temperature. The cells were washed twice in PBS and immunostained with a FITC-conjugated secondary antibody during 1 h at 4°C. After two washes with PBS, the cells were analyzed by flow cytometry and by fluorescence microscopy.

Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) histochemical analysis. The staining of SA-β-gal was performed at pH = 6.0 according to the manufacturer's protocol (Sigma Aldrich). Briefly, cells were washed twice with PBS 1x and then fixed in a solution containing 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde. Fixed cells were stained for 10 min at 37°C with an acidic solution (pH = 6.0) containing X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside). After overnight incubation, the cells were washed with PBS 1X and the staining pattern was analyzed by microscopy (Leica, DM 2000). As a positive control, K562 cells treated up to 4 d with 100 nM of doxorubicine (Sigma Aldrich) were used.[80]

RNA extraction and real-time PCR analysis. Total RNA from U937 and K562 cells treated with COX-2 inhibitors was extracted using the Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's protocol. To study mRNA stability, the cells were pre-treated with 100 μM nimesulide or 40 μM celecoxib for the indicated times; cells where then incubated with the transcription inhibitor actinomycin D (5 μg/ml) and total mRNA was extracted after 20, 40 or 60 min. cDNA was synthesized using the Superscript™ First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). One μg RNA was used for reverse transcription, using oligo(dT) primers. cDNA products were used for PCR amplification using the Platinum® High Fidelity *Taq* DNA Polymerase and gene-specific primers for COX-1 (sense: 5'-TCA TCC GAG AGA TGC TCA TGC G-3'; antisense: 5'-AGA CCA GGC ACC AGA CCA AAG ACC-3'), COX-2 (sense: 5'-GCC CAG CAC TTC ACG CAT CAG-3'; antisense: 5'-AGA CCA GGC ACC AGA CCA AAG ACC-3'), c-Myc (sense: 5'-TGC TCC ATG AGG AGA CAC C-3'; antisense: 5'-TCG ATT TCT TCC TCA TCT TCT TG-3'), cyclin D1 (sense: 5'-CGT GGC CTC TAA GAT GAA GG-3'; antisense: 5'-CCA CTT GAG CTT GTT CAC CA-3'), PCNA (sense: 5'-GGC GTG AAC CTC ACC AGT AT-3'; antisense: 5'-AGG TAT CCG CGT TAT CTT CG-3'), and p27 (sense: 5'-AAT AAG GAA GCG ACC TGC AA-3'; antisense: 5'-GGG GAA CCG TCT GAA ACA TT-3') and Rb1 (sense: 5'-TGC TAT GTC AAG ACT GTT GAA GAA-3'; antisense: 5'-AAC TGC TGG GTT GTG TCA AA-3'). β-actin was used as a control (sense: 5'-CTG GAA CGG TGA AGG TGA CA-3'; antisense: 5'-AAG GGA CTT CCT GTA ACA ATG CA-3'). All the primers were from Eurogentec. cDNA amplification was performed for 40 cycles with the following settings: 94°C for 2 min, 60°C for 1 min and 68°C for 2 min. Results were expressed as a ratio: mRNA of target gene/β-actin mRNA.

Total protein extraction. Total cell extracts were prepared using Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER, Pierce) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 x 10^6 cells per sample were washed with PBS and the pellet was resuspended in 500 μl of M-PER® supplemented with protease inhibitor cocktail (Complete, Roche) and phosphatase inhibitor cocktail (PhosphoStop®, Roche). The suspension was put on a shaker with vertical agitation for 15 min at 4°C and then centrifuged at 15,000 g for 15 min at 4°C. Supernatants were removed, aliquoted and stored at -80°C until use. For protein stability studies, cells were treated with 10 μg/ml cycloheximide for 5, 10, 20, 40 or 60 min.

©2010 Landes Bioscience. Do not distribute.

Immunoblot analysis. Total protein extract (20 μg, unless otherwise specified) was separated by size using sodium dodecyl sulfate PAGE (SDS-PAGE; 10%). Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes. β-actin was used as a loading control. Subsequent immunoblotting was performed by blocking non-specific binding regions of the membranes with 5% non-fat milk in PBS-Tween (1 h). Membranes were then incubated with 0.5–1 μg/ml of the following primary antibodies: 1 h for anti-β-actin (Sigma) or overnight for anti-COX-1, anti-COX-2, anti-p27, anti-cyclin D1, anti-PCNA (Santa Cruz Biotechnology), anti-cyclin D1 and anti-c-Myc (Cell Signaling), anti-phospho ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-phospho-$p38^{MAPK}$, anti-$p38^{MAPK}$ (BD Biosciences). The membranes were then washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). All antibodies were diluted in a PBS-Tween solution containing 5% of bovine serum albumin (BSA) or 5% of milk. The protein bands were revealed using the ECL Plus western Blotting Detection System Kit (GE Healthcare). Densitometric quantification of the bands was performed using ImageJ 1.43 u software (www3.imperial.ac.uk/portal/page/portallive/imagingfacility/links/imaging_software).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the Student's t-test for unpaired data. p values ≤0.05 were considered significant. To confirm the dose-dependent effect of some treatments, ANOVA parametric analysis was used.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

C.S. and C.C. are recipients of doctoral and postdoctoral Télévie grants, respectively. Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by "Recherche Cancer et Sang" Foundation, by the "Recherches Scientifiques Luxembourg" association, by "Een Haerz fir kriibskrank Kanner" association, by the Action Lions "Vaincre le Cancer" association and by Télévie Luxembourg. Editing and print costs are covered by the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg.

Note

Supplemental material can be found at:
www.landesbioscience.com/journals/cc/article/16460

References

1. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995; 267:1456-62; PMID:7878464; DOI:10.1126/science.7878464.
2. Zdanov S, Bernard D, Debacq-Chainiaux F, Martien S, Gosselin K, Vercamer C, et al. Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity. Exp Cell Res 2007; 313:3046-56; PMID:17560572; DOI:10.1016/j.yexcr.2007.04.033.
3. Grimes A, Chandra SB. Significance of cellular senescence in aging and cancer. Cancer Res Treat 2009; 41:187-95; PMID:20057963; DOI:10.4143/crt.2009.41.4.187.
4. Lleonart ME, Artero-Castro A, Kondoh H. Senescence induction; a possible cancer therapy. Mol Cancer 2009; 8:3; PMID:19133111; DOI:10.1186/1476-4598-8-3.
5. Saretzki G. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. Curr Pharm Des 2010; 16:79-100; PMID:20214620; DOI:10.2174/138161210789941874.
6. Schmitt CA. Cellular senescence and cancer treatment. Biochim Biophys Acta 2007; 1775:5-20.
7. Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell cycle dysregulation and anticancer therapy. Trends Pharmacol Sci 2003; 24:139-45; PMID:12628359; DOI:10.1016/S0165-6147(03)00026-9.
8. Abelev GI. Differentiation mechanisms and malignancy. Biochemistry (Mosc) 2000; 65:107-16; PMID:10702645.
9. Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, Liebermann DA. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. Oncogene 2002; 21:3414-21; PMID:12032779; DOI:10.1038/sj.onc.1205400.
10. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 1995; 146:3-15; PMID:7856735.
11. Buolamwini JK. Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery. Curr Pharm Des 2000; 6:379-92; PMID:10788588; DOI:10.2174/1381612003400948.
12. Junttila MR, Westermarck J. Mechanisms of MYC stabilization in human malignancies. Cell Cycle 2008; 7:592-6; PMID:18256542; DOI:10.4161/cc.7.5.5492.
13. Facchini LM, Penn LZ. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. FASEB J 1998; 12:633-51; PMID:9619443.
14. Prochownik EV. c-Myc as a therapeutic target in cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2004; 4:289-302; PMID:15056059; DOI:10.1586/14737140.4.2.289.
15. Daksis JI, Lu RY, Facchini LM, Marhin WW, Penn LJ. Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. Oncogene 1994; 9:3635-45; PMID:7526316.
16. Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell cycle transitions: does one fit all? Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9:910-6; PMID:18813291; DOI:10.1038/nrm2510.
17. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. Oncogene 1997; 14:629-40; PMID:9038370; DOI:10.1038/sj.onc.1200886.
18. Rivard N, L'Allemain G, Bartek J, Pouyssegur J. Abrogation of $p27^{Kip1}$ by cDNA antisense suppresses quiescence (G_0 state) in fibroblasts. J Biol Chem 1996; 271:18337-41; PMID:8702474; DOI:10.1074/jbc.271.31.18337.
19. Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. Genome Biol 2004; 5:241; PMID:15345041; DOI:10.1186/gb-2004-5-9-241.
20. Choi SH, Bosetti F. Cyclooxygenase-1 null mice show reduced neuroinflammation in response to beta-amyloid. Aging (Albany NY) 2009; 1:234-44; PMID:20157512.
21. Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. J Cell Physiol 2002; 190:279-86; PMID:11857443; DOI:10.1002/jcp.10068.
22. Arun B, Goss P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. Semin Oncol 2004; 31:22-9; PMID:15179621; DOI:10.1053/j.seminoncol.2004.03.042.
23. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. Int J Cell Biol 2010; 2010:215158; PMID:20339581; DOI:10.1155/2010/215158.
24. Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, Shoji Y, Takahashi M, Kawamori T, et al. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. Cancer Res 2002; 62:28-32; PMID:11782353.
25. Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. Leuk Res 2004; 28:179-90; PMID:14654083; DOI:10.1016/S0145-2126(03)00183-8.
26. Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, Lafavia E, Coppola S, Colussi C, et al. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. FASEB J 1998; 12:479-86; PMID:9535220.
27. Yang W, Shen J, Wu M, Arsura M, FitzGerald M, Suldan Z, et al. Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. Oncogene 2001; 20:1688-702; PMID:11313917; DOI:10.1038/sj.onc.1204245.
28. Jones TR, Cole MD. Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of the 3' untranslated sequences. Mol Cell Biol 1987; 7:4513-21; PMID:3325826.
29. Bermudez Y, Yang H, Cheng JQ, Kruk PA. Pyk2/ERK 1/2 mediate Sp1- and c-Myc-dependent induction of telomerase activity by epidermal growth factor. Growth Factors 2008; 26:1-11; PMID:18365874; DOI:10.1080/08977190802001389.
30. Chen S, Qiong Y, Gardner DG. A role for p38 mitogen-activated protein kinase and c-myc in endothelin-dependent rat aortic smooth muscle cell proliferation. Hypertension 2006; 47:252-8; PMID:16365184; DOI:10.1161/01.HYP.0000198424.93598.6b.
31. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both the G_2/M and the G_1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:8493-7; PMID:7667317; DOI:10.1073/pnas.92.18.8493.
32. Irwin MS, Miller FD. p73: regulator in cancer and neural development. Cell Death Differ 2004; 11:17-22; PMID:15153941; DOI:10.1038/sj.cdd.4401452.
33. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G_2/M transition by p53. Oncogene 2001; 20:1803-15; PMID:11313928; DOI:10.1038/sj.onc.1204252.
34. Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. Science 2005; 310:1504-10; PMID:16293724; DOI:10.1126/science.1116221.
35. Doherty GA, Byrne SM, Molloy ES, Malhotra V, Austin SC, Kay EW, et al. Proneoplastic effects of PGE2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer. BMC Cancer 2009; 9:207; PMID:19558693; DOI:10.1186/1471-2407-9-207.
36. Yu L, Wu WK, Li ZJ, Li HT, Wu YC, Cho CH. Prostaglandin E(2) promotes cell proliferation via protein kinase C/extracellular signal regulated kinase pathway-dependent induction of c-Myc expression in human esophageal squamous cell carcinoma cells. Int J Cancer 2009; 125:2540-6; PMID:19623651; DOI:10.1002/ijc.24607.
37. Dimberg A, Oberg F. Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines. Leuk Lymphoma 2003; 44:1641-50; PMID:14692514; DOI:10.1080/1042819031000083316.
38. Kirkland TN, Viriyakosol S. Structure-function analysis of soluble and membrane-bound CD14. Prog Clin Biol Res 1998; 397:79-87; PMID:9575549.
39. Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seed B. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. Blood 1989; 73:284-9; PMID:2462937.
40. Nakayama F, Nishihara S, Iwasaki H, Kudo T, Okubo R, Kaneko M, et al. CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha-1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha-1,3-fucosyltransferase IV. J Biol Chem 2001; 276:16100-6; PMID:11278338; DOI:10.1074/jbc.M007272200.
41. Kerr MA, Stocks SC. The role of CD15-(Le(X))-related carbohydrates in neutrophil adhesion. Histochem J 1992; 24:811-26; PMID:1362195; DOI:10.1007/BF01046353.
42. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody K_i-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. J Cell Biol 1993; 123:513-22; PMID:8227122; DOI:10.1083/jcb.123.3.513.
43. Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Quantifying pharmacologic suppression of cellular senescence: prevention of cellular hypertrophy versus preservation of proliferative potential. Aging (Albany NY) 2009; 1:1008-16; PMID:20157583.
44. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:9363-7; PMID:7568133; DOI:10.1073/pnas.92.20.9363.
45. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. J Cell Sci 2000; 113:3613-22; PMID:11017877.
46. Tani T, Ylanne J, Virtanen I. Expression of megakaryocytic and erythroid properties in human leukemic cells. Exp Hematol 1996; 24:158-68; PMID:8641337.

©2011 Landes Bioscience. Do not distribute.

47. Hassan HT, Freund M. Characteristic biological features of human megakaryoblastic leukaemia cell lines. Leuk Res 1995; 19:589-94; PMID:7564468; DOI:10.1016/0145-2126(95)00027-L.
48. Li J, Chen X, Dong X, Xu Z, Jiang H, Sun X. Specific COX-2 inhibitor, meloxicam, suppresses proliferation and induces apoptosis in human HepG2 hepatocellular carcinoma cells. J Gastroenterol Hepatol 2006; 21:1814-20; PMID:17074019; DOI:10.1111/j.1440-746.2006.04366.x.
49. Yao M, Lam EC, Kelly CR, Zhou W, Wolfe MM. Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. Br J Cancer 2004; 90:712-9; PMID:14760389; DOI:10.1038/sj.bjc.6601489.
50. Nakanishi Y, Kamijo R, Takizawa K, Hatori M, Nagumo M. Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukaemia cell lines. Eur J Cancer 2001; 37:1570-8; PMID:11506967; DOI:10.1016/S0959-8049(01)00160-5.
51. Cusimano A, Azzolina A, Iovanna JL, Bachvarov D, McCubrey JA, D'Alessandro N, et al. Novel combination of celecoxib and proteasome inhibitor MG132 provides synergistic antiproliferative and proapoptotic effects in human liver tumor cells. Cell Cycle 2010; 9:1399-410; PMID:20305374; DOI:10.4161/cc.9.7.11254.
52. Xia JJ, Pei LB, Zhuang JP, Ji Y, Xu GP, Zhang ZP, et al. Celecoxib inhibits beta-catenin-dependent survival of the human osteosarcoma MG-63 cell line. J Int Med Res 2010; 38:1294-304; PMID:20926002.
53. Gera JF, Mellinghoff IK, Shi Y, Rettig MB, Tran C, Hsu JH, et al. AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. J Biol Chem 2004; 279:2737-46; PMID:14576155; DOI:10.1074/jbc.M309999200.
54. Kuang X, Shen J, Wong PK, Yan M. Deregulation of mTOR signaling is involved in thymic lymphoma development in Atm$^{-/-}$ mice. Biochem Biophys Res Commun 2009; 383:368-72; PMID:19364503; DOI:10.1016/j.bbrc.2009.04.019.
55. Mazzoletti M, Bortolin F, Brunelli L, Pastorelli R, Di Giandomenico S, Erba E, et al. COMBINATION OF PI3K/mTOR INHIBITORS: ANTITUMOR ACTIVITY AND MOLECULAR CORRELATES. Cancer Res 2011.
56. Qian Y, Chen X. Tumor suppression by p53: making cells senescent. Histol Histopathol 2010; 25:515-26; PMID:20183804.
57. Johnson JL, Wimsatt J, Buckel SD, Dyer RD, Maddipati KR. Purification and characterization of prostaglandin H synthase-2 from sheep placental cotyledons. Arch Biochem Biophys 1995; 324:26-34; PMID:7503555; DOI:10.1006/abbi.1995.9934.
58. Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. Leuk Res 2004; 28:179-90; PMID:14654083; DOI:10.1016/S0145-2126(03)00183-8.
59. Howe LR. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. Breast Cancer Res 2007; 9:210; PMID:17640394; DOI:10.1186/bcr1678.
60. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001; 41:661-90; PMID:11264472; DOI:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.661.
61. Laurora S, Pizzimenti S, Briatore F, Fraioli A, Maggio M, Reffo P, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands affect growth-related gene expression in human leukemic cells. J Pharmacol Exp Ther 2003; 305:932-42; PMID:12649303; DOI:10.1124/jpet.103.049098.
62. Yasugi E, Horiuchi A, Uemura I, Okuma E, Nakatsu M, Saeki K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate myeloid differentiation and lipogenensis in human leukemia NB4 cells. Dev Growth Differ 2006; 48:177-88; PMID:16573735; DOI:10.1111/j.1440-169X.2006.00855.x.
63. Ross SE, Radomska HS, Wu B, Zhang P, Winnay JN, Bajnok L, et al. Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis. Mol Cell Biol 2004; 24:675-86; PMID:14701740; DOI:10.1128/MCB.24.2.675-86.2004.
64. Johansen LM, Iwama A, Lodie TA, Sasaki K, Felsher DW, Golub TR, et al. c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. Mol Cell Biol 2001; 21:3789-806; PMID:11340171; DOI:10.1128/MCB.21.11.3789-806.2001.
65. Pedrazzoli P, Bains MA, Watson R, Fisher J, Hoy TG, Jacobs A. c-myc and c-myb oncoproteins during induced maturation of myeloid and erythroid human leukemic cell lines. Cancer Res 1989; 49:6911-6; PMID:2684403.
66. Valentin M, Yang E. Autophagy is activated, but is not required for the G_0 function of BCL-2 or BCL-x_L. Cell Cycle 2008; 7:2762-8; PMID:18758240; DOI:10.4161/cc.7.17.6595.
67. Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. Cell Cycle 2008; 7:3355-61; PMID:18948731; DOI:10.4161/cc.7.21.6919.
68. Korotchkina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, Demidenko ZN, Gudkov AV, Blagosklonny MV. The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. Aging (Albany NY) 2010; 2:344-52; PMID:20606252.
69. Almog N. Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. Cancer Lett 2010; 294:139-46; PMID:20363069; DOI:10.1016/j.canlet.2010.03.004.
70. Korah R, Boots M, Wieder R. Integrin alpha5beta1 promotes survival of growth-arrested breast cancer cells: an in vitro paradigm for breast cancer dormancy in bone marrow. Cancer Res 2004; 64:4514-22; PMID:15231661; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-03-3853.
71. Mesquita PM, Wilson SS, Manlow P, Fischetti L, Keller MJ, Herold BC, et al. Candidate microbicide PPCM blocks human immunodeficiency virus type 1 infection in cell and tissue cultures and prevents genital herpes in a murine model. J Virol 2008; 82:6576-84; PMID:18434407; DOI:10.1128/JVI.00335-08.
72. Malempati S, Tibbitts D, Cunningham M, Akkari Y, Olson S, Fan G, et al. Aberrant stabilization of c-Myc protein in some lymphoblastic leukemias. Leukemia 2006; 20:1572-81; PMID:16855632; DOI:10.1038/sj.leu.2404317.
73. Gualdrini F, Corvetta D, Cantilena S, Chayka O, Tanno B, Raschella G, et al. Addiction of MYCN amplified tumours to B-MYB underscores a reciprocal regulatory loop. Oncotarget 2010; 1:278-88; PMID:21304178.
74. Raffoux E, Cras A, Recher C, Boelle PY, de Labarthe A, Turlure P, et al. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. Oncotarget 2010; 1:34-42; PMID:21293051.
75. Jamshidi F, Zhang J, Harrison JS, Wang X, Studzinski GP. Induction of differentiation of human leukemia cells by combinations of COX inhibitors and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 involves Raf1 but not Erk 1/2 signaling. Cell Cycle 2008; 7:917-24; PMID:18414055; DOI:10.4161/cc.7.7.5620.
76. Chen TC, Holick MF, Lokeshwar BL, Burnstein KL, Schwartz GG. Evaluation of vitamin D analogs as therapeutic agents for prostate cancer. Recent Results Cancer Res 2003; 164:273-88; PMID:12899529.
77. Wang X, Gocek E, Novik V, Harrison JS, Danilenko M, Studzinski GP. Inhibition of Cot1/Tlp2 oncogene in AML cells reduces ERK5 activation and upregulates $p27^{Kip1}$ concomitant with enhancement of differentiation and cell cycle arrest induced by silibinin and 1,25-dihydroxyvitamin D(3). Cell Cycle 2010; 9:4542-51; PMID:21084834; DOI:10.4161/cc.9.22.13790.
78. Juncker T, Cerella C, Teiten MH, Morceau F, Schumacher M, Ghelfi J, et al. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. Biochem Pharmacol 2011; 81:13-23; PMID:20849830; DOI:10.1016/j.bcp.2010.08.025.
79. Schnekenburger M, Morceau F, Duvoix A, Delhalle S, Trentesaux C, Dicato M, et al. Increased glutathione S-transferase P1-1 expression by mRNA stabilization in hemin-induced differentiation of K562 cells. Biochem Pharmacol 2004; 68:1269-77; PMID:15313425; DOI:10.1016/j.bcp.2004.03.047.
80. Schnekenburger M, Grandjenette C, Ghelfi J, Karius T, Foliguet B, Dicato M, et al. Sustained exposure to the DNA demethylating agent, 2'-deoxy-5-azacytidine, leads to apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia by promoting differentiation, senescence and autophagy. Biochem Pharmacol 2011; 81:364-78; PMID:21044612; DOI:10.1016/j.bcp.2010.10.013.

©2011 Landes Bioscience. Do not distribute.

Biochemical Pharmacology xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

COX-2 inhibitors block chemotherapeutic agent-induced apoptosis prior to commitment in hematopoietic cancer cells

Claudia Cerella [a], Cyril Sobolewski [a], Sébastien Chateauvieux [a], Estelle Henry [a], Michael Schnekenburger [a], Jenny Ghelfi [a], Mario Dicato [b], Marc Diederich [a,*]

[a] Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg
[b] Department of Hematology–Oncology, Centre Hospitalier, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 March 2011
Accepted 16 June 2011
Available online xxx

Keywords:
Nimesulide
NS-398
Celecoxib
Chemoresistance
Mitochondrial pathway

ABSTRACT

Enzymatic inhibitors of pro-inflammatory cyclooxygenase-2 (COX-2) possess multiple anti-cancer effects, including chemosensitization. These effects are not always linked to the inhibition of the COX-2 enzyme. Here we analyze the effects of three COX-2 enzyme inhibitors (nimesulide, NS-398 and celecoxib) on apoptosis in different hematopoietic cancer models. Surprisingly, COX-2 inhibitors strongly prevent apoptosis induced by a panel of chemotherapeutic agents. We selected U937 cells as a model of sensitive cells for further studies. Here, we provide evidence that the protective effect is COX-independent. No suppression of the low basal prostaglandin (PG)E_2 production may be observed upon treatment by COX-2 inhibitors. Besides, the non-active celecoxib analog 2,5-dimethyl-celecoxib is able to protect from apoptosis as well. We demonstrate early prevention of the stress-induced apoptotic signaling, prior to Bax/Bak activation. This preventive effect fits with an impairment of the ability of chemotherapeutic agents to trigger apoptogenic stress. Accordingly, etoposide-induced DNA damage is strongly attenuated in the presence of COX-2 inhibitors. In contrast, COX-2 inhibitors do not exert any anti-apoptotic activity when cells are challenged with physiological stimuli (anti-Fas, TNFα or Trail) or with hydrogen peroxide, which do not require internalization and/or are not targeted by chemoresistance proteins. Altogether, our findings show a differential off-target anti-apoptotic effect of COX-2 inhibitors on intrinsic *vs.* extrinsic apoptosis at the very early steps of intracellular signaling, prior to commitment. The results imply that an exacerbation of the chemoresistance phenomena may be implicated.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Synthetic enzymatic inhibitors of the pro-inflammatory mediator cyclooxygenase-2 (COX-2) are pharmacological agents with important anti-cancer activities [1]. After the identification of the second inducible form of COX enzymes in the 1990s, numerous studies demonstrated that COX-2 is stably expressed in various cancers [2]. More detailed studies have described an aberrant constitutive COX-2 expression since the very early steps of carcinogenesis [3]. Accordingly, many *in vitro* and *in vivo* studies strongly suggested multiple pro-carcinogenic roles for COX-2 overexpression, ranging from the promotion of mutant cell proliferation to a causative role in determining chemotherapy failure favoring metastasis formation [1]. A consistent number of studies are based on the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which still represent the only available pharmacological approach to counteract COX-2 functions *via* inhibition of its enzymatic activity [1,4].

In some instances, COX-2 inhibitors affect cancer cell viability *per se* [5–7]; in other instances, these compounds sensitize cancer cells to other cytocidal treatments [8–10]. Sensitization to apoptosis has been demonstrated in the case of chemotherapeutic agents that activate the intrinsic (or mitochondrial) apoptotic pathway [10,11] as well as with agents that trigger the extrinsic (death receptor-mediated) apoptotic pathway (*i.e.*, TRAIL or TNFα) [8,12,13]. The published mechanisms appear quite heterogeneous. The disturbance of the pro-survival AKT-dependent pathway

Abbreviations: Bak, Bcl-2 homologous antagonist killer; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Bcl-Xl, B-cell lymphoma-extra large; CPT, camptothecin; CISP, cisplatin; COX-2, cyclooxygenase-2; CTR-1, copper transporter 1; CYT, cytarabine; DMC, 2,5-dimethyl-celecoxib; DOXO, doxorubicin; Fas, apoptosis stimulating fragment; γ-H2A.x, phosphorylated histone H2A.x; H_2O_2, hydrogen peroxide; IAP, inhibitor of apoptosis; IRINO, irinotecan; MDR-1, multidrug resistance protein 1; MRP-1, multidrug resistance-associated protein 1; MRP-6, multidrug resistance-associated protein 6; MTX, methotrexate; PMC, puromycin; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; Rh 123, rhodamine 1,2,3; TNFα, tumour necrosis factor alpha; TRAIL, TNF-related apoptosis inducing ligand; VP16, etoposide; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein.

* Corresponding author. Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060.
E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

0006-2952/$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bcp.2011.06.028

Please cite this article in press as: Cerella C, et al. COX-2 inhibitors block chemotherapeutic agent-induced apoptosis prior to commitment in hematopoietic cancer cells. Biochem Pharmacol (2011), doi:10.1016/j.bcp.2011.06.028

[5,12], the counteraction of multi-drug resistance phenomena [14,15], an altered balance of the level of expression of anti-apoptotic *vs.* pro-apoptotic Bcl-2 family members [5,16] and the up-regulation [17] and promotion of clustering of death receptors [13] have been evoked to play a causative role. However, not all anti-cancer effects of synthetic COX-2 inhibitors may actually be ascribed to the inhibition of the COX-2 enzyme. Studies identifying the concentration of COX-2 inhibitors able to impact production of prostaglandins or studies based on the silencing of COX-2 gene expression by RNA interference-based approaches have not always confirmed the anti-cancer effects of COX-2 inhibitors, indicating the existence of COX-2-independent effects [1]. Some of these studies mention that the down-regulation of COX-2 expression is a factor that partially contributes but is not sufficient to completely describe the anti-cancer effects of COX-2 inhibitors [18,19]. The scenario is further complicated by the fact that the biological properties of COX-2 inhibitors sometimes appear to be confirmed by COX-2 gene down-regulation and sometimes not, even when the studies deal with the same COX-2 inhibitor [19,20]. The heterogeneity of the different cancer cell models used is one of the factors most often evoked to explain these contradictory results. Recently, a few studies have reported potential anti-apoptotic effects, which have so far been confined to specific conditions or compounds [20,21]. Nevertheless, a large body of evidence regarding the anti-cancer potential of COX-2 inhibitors has put these compounds at the centre of many investigations as a strategy to improve or develop further successful anti-cancer therapeutic approaches.

The data concerning the effects of COX-2/and COX-2 inhibitors on cancer cells has so far derived mainly from adherent cell models. More recently, evidence for a stable COX-2 expression was also found in leukemic/lymphoblastic cancers, where a similar pro-carcinogenic role of COX-2 has been hypothesized [22,23].

In this study, we investigated the effects of three COX-2 inhibitors (nimesulide, NS-398 and celecoxib) on apoptosis induced by a panel of cytocidal treatments. Here we show that all three inhibitors specifically counteract cell death induced by chemotherapeutic agents that trigger stress-mediated apoptosis but not by physiological stimuli, which act *via* death receptor activation. The differential effect on intrinsic *vs.* extrinsic apoptosis is a consequence of the ability of COX-2 inhibitors to prevent stress-induced apoptosis at the very early steps of the intracellular signaling, prior to commitment. This effect appears to be COX-2 independent.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Nimesulide and NS-398 were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Celecoxib was from Merck (Leuven, Belgium). Anti-Fas (clone CH11) was from Millipore, Upstate (Lake Placid, NY, USA). TNFα was purchased from Reliatech (Wolfenbüttel, Germany), Superkiller Trail was from Alexis Axxora (Zandhoven, Belgium). Etoposide, puromycin, hydrogen peroxide, doxorubicin, camptothecin, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were from SIGMA (Bornem, Belgium). Cisplatin and methotrexate were purchased from Teva Pharma Belgium (Wilrijk, Belgium), irinotecan and cytarabine were from Pfizer Pharmaceuticals (Bruxelles, Belgium).

2.2. Cell culture and treatments

U937 (human histiocytic lymphoma), Jurkat (acute lymphoid leukemic T cells), K562 (chronic myeloid leukemia), Raji (Burkitt's lymphoma), Hel (human megakaryocytic acute myeloid leukemia), cells (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Braunschweig, Germany) were cultured in RPMI 1640 medium (Bio-Whittaker, Verviers, Belgium) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS; Lonza, Verviers, Belgium), 1% (v/v) antibiotic–antimycotic solution (Lonza, Verviers, Belgium) and 2 mM L-glutamine (Lonza). KBM5 (chronic myeloid leukemia) were kindly donated by Dr. Bharat B. Aggarwal and cultured in IMDM medium (Bio-Whittaker, Verviers, Belgium) containing 15% (v/v) fetal calf serum (FCS; Lonza). All the cell lines were kept at 37 °C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Cells were pre-treated for 24 h with nimesulide, NS-398 (0–100 μM) or celecoxib (0–40 μM) before other treatments.

2.3. Induction of apoptosis

Apoptosis was induced with: (a) stressing compounds: the topoisomerase II inhibitor etoposide (VP16; 100 μM, 4 h); the topoisomerase I inhibitors camptothecin (CPT; 10 μM, 8 h) and irinotecan (IRINO; 10 μM, 8 h), the alkylating agent cisplatin (CISP; 100 μM, 24 h); the DNA intercalating agent doxorubicin (DOXO; 4 μM, 8 h), the metabolite analogues methotrexate (MTX; 20 μM, 8 h) and cytarabine (CYT; 10 μM, 24 h); the protein synthesis inhibitor puromycin (PMC; 10 μg/ml, 5 h); and the oxidative stress inducer hydrogen peroxide (H_2O_2; 500 μM); (b) physiological stimuli: anti-Fas (clone CH11; 50 nM, 16 h); TNFα (1 ng/ml, 16 h); and Trail (0.5 μg/ml, 8 h). Freshly prepared H_2O_2 was added to the medium and incubated for 1 h at 37 °C; the cells were then washed and resuspended in fresh medium (recovery phase). All the other treatments were kept throughout the experiment.

2.4. Analysis of apoptosis

Apoptosis was measured by analysis of nuclear fragmentation (1 μg/ml Hoechst 33342) [24] and confirmed by the estimation of mitochondrial membrane potential loss by incubating 1×10^6 cells at 37 °C for 20 min with 50 nM MitoTracker® Red (MTR, Molecular Probes/Invitrogen, Merelbeke, Belgium) [24], followed by flow cytometric analysis (FACScalibur, BD Biosciences, San José, CA, USA).

2.5. RNA extraction and real-time PCR analysis

Total RNA from U937 and K562 cells was extracted as previously published [25]. One microgram of RNA was used for reverse transcription with oligo(dT) primers. cDNA products were used for PCR amplification with the Platinum® High Fidelity *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) and gene-specific primers for COX-2 (forward: 5′-GCCCAGCACTTCACGCATGAG-3′; reverse: 5′-AGACCAGGCACCAGACCAAAGACC-3′), MDR-1 (forward: 5′-CAGAGGGGATGGTCAGTGTT-3′; reverse: 5′-CCTGACTCACCACACCAATG-3′), MRP-1 (forward: 5′-CCTGTTCAACGTCATTGGTG-3′; reverse: 5′-AGCCACGTAGAACCTCTGGA-3′), and β-actin was used as a control (forward: 5′-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3′) (reverse: 5′-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3′). All primers were from Eurogentec (Liege, Belgium). cDNA amplification was performed for 40 cycles with the following settings: 94 °C for 2 min, 60 °C for 1 min and 68 °C for 2 min. Results were expressed as the ratio of mRNA of target gene/mRNA β-actin.

2.6. Indirect immunofluorescence

U937 cells were fixed/permeabilized and immunostained as described [24]. The following parameters were analyzed: (a) mitochondrial cytochrome *c* release [26]; (b) Bax/Bak status activation (monoclonal mouse anti-Bax 6A7; Santa Cruz

Please cite this article in press as: Cerella C, et al. COX-2 inhibitors block chemotherapeutic agent-induced apoptosis prior to commitment in hematopoietic cancer cells. Biochem Pharmacol (2011), doi:10.1016/j.bcp.2011.06.028

Biotechnology, Boechout, Belgium; monoclonal mouse anti-Bak AB-1; Calbiochem, Leuven, Belgium); (c) Bax translocation to mitochondria by co-immunostaining U937 cells with the polyclonal rabbit anti-Bax (Δ-21; Santa Cruz Biotechnology) and anti-cytochrome c oxidase IV (COX IV, Santa Cruz Biotechnology) [27]; (d) DNA damage assessment, estimated by phosphorylation of histone H2A.x using the mouse monoclonal anti-γH2A.x (ser139; Millipore, Upstate) [28]; (e) multidrug resistance protein expression, MDR-1 (BD Biosciences Pharmingen, Erembodegem, Belgium) and MRP-1 (Santa Cruz Biotechnology). *In situ* analysis of immunostained cells include: (a) observation by fluorescence microscopy (Olympus, Hamburg, Germany). The images were analyzed and elaborated using the cell Cell^M software (Olympus Soft Images Solutions GMBH, Münster, Germany); (b) flow cytometric analysis. Events were recorded statistically (10,000 events/sample) using the CellQuest software (http://www.bdbiosciences.com/features/products/display_product.php?keyID=92). Data were further analyzed by using FlowJo software (http://www.flowjo.com/index.php).

2.7. Measurement of PGE_2 concentration

Prostaglandin E_2 (PGE_2) levels in cell culture supernatants were determined by using the prostaglandin E_2 EIA kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA), which is based on competitive enzyme immunoassay using PGE_2 coupled with acetylcholinesterase as a tracer, according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were seeded at a concentration of 0.5×10^6 cells/ml. After 24 h of treatment with COX-2 inhibitors, cells were centrifuged (350 g) and 50 μl of supernatant was collected. The concentrations of PGE_2 were determined according to a standard curve (in pg/ml) and were normalized by cell concentration. As a positive control, K562 cells treated for 24 h with 160 nM of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, SIGMA) were used [29].

2.8. Drug efflux assay

U937 cells (10^6/ml) were incubated with 10 nM rhodamine 1, 2, 3 (Rh 123, SIGMA) for 30 min at 37 °C in normal culture conditions. Then, the fluorescent dye was washed out and the cells were seeded in fresh complete medium (recovery). COX-2 inhibitors were added again. Fluorescence was evaluated immediately ($T = 0$ h) and after 3 h ($T = 3$ h) of recovery time by flow cytometer analysis with FL2 (585/42 nm). The extent of drug efflux was calculated as a percentage of reduction of Rh 123 fluorescence (1-Rh 123 fluorescence ratio $T = 3$ h/$T = 0$ h) for each sample.

2.9. Western blot analysis

Protein separation by gel electrophoresis, protein transfer to nitrocellulose membranes and immunoblotting were performed as previously detailed [24]. Equal loading of samples was performed using β-actin as a control. A total of 5 μg of mouse macrophage lysate (BD Transduction Laboratories, Erembodegem, Belgium) co-stimulated with 10 ng/ml interferon γ(IFNγ) and 1 μg/ml lipopolysaccharide (LPS) was used as a positive control for COX-2 expression, according to the manufacturer's instructions. Primary antibodies: mouse monoclonal anti-β-actin, mouse monoclonal anti-caspase-3, goat polyclonal anti-COX-2, rabbit anti-CTR1 (Santa Cruz Biotechnology), anticaspase-8, anti-caspase-9 (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands), anti-Bcl-xL (BD Transduction Laboratories), anti-Bcl-2 (Calbiochem, Leuven, Belgium). Incubation with the corresponding secondary antibodies (diluted in a PBS–Tween solution containing 5% of bovine serum albumin, BSA, or 5% of milk) was performed according to the manufacturer's instructions (HRP conjugated donkey anti-goat, goat anti-rabbit or goat anti-mouse from Santa Cruz Biotechnology). Specific immunoreactive proteins were visualized by autoradiography using the ECL Plus Western Blotting Detection System Kit (GE Healthcare, Roosendaal, The Netherlands).

2.10. Statistical analysis

Data are expressed as means ± SD, and the significance degree was analyzed by the Student's *t*-test. *p*-values below 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. COX-2 inhibitors prevent stress-induced apoptosis without affecting apoptosis induced by physiological stimuli

U937 cells (Fig. 1A) were incubated for 24 h with different concentrations (10–100 μM) of one of the two COX-2 inhibitors nimesulide or NS-398. Then, cells were challenged with the chemotherapeutic agent etoposide (VP16; 100 μM). Both inhibitors did not impact cell viability *per se* but they prevented VP16-induced apoptosis in a dose-dependent manner, as determined by the analysis of nuclear morphology (Fig. 1B and C) and confirmed by the detection of caspase-3 cleavage (Fig. 1D and E).

To exclude that this effect was specific for VP16, we challenged U937 cells with different agents. Six chemotherapeutic agents, which trigger the intrinsic apoptotic pathway *via* different mechanisms (see Section 2), resulted strongly inhibited in their action by nimesulide comparable to VP16 (Fig. 2A); conversely, when cells were challenged with anti-Fas (50 nM), TNFα (1 ng/ml) or Trail (0.5 μg/ml), which initiate the extrinsic apoptotic pathway, COX-2 inhibitors did not play any modulating role (Fig. 2B). Similar results were observed with NS-398 (data not shown).

Since U937 cells stably express COX-2 (Fig. 1A), we investigated whether the anti-apoptotic effect depends on the inhibition of COX-2 enzyme activity or whether it was the consequence of an off-target effect. To address the question, first, we analyzed if the selective COX-2 inhibitor celecoxib, structurally unrelated to nimesulide and NS-398 [1] might prevent also apoptosis; besides, we tested the effect of its analog 2,5-dimethyl celecoxib (DMC) on apoptosis. This compound lacks the COX-2 inhibitory activity [30]. In U937 cells, incubated for 24 h with celecoxib (in the non cytotoxic range of 10–40 μM), then challenged with 100 μM VP16, the resulting apoptosis was prevented in a dose-dependent manner (Fig. 3A). DMC appeared toxic *per se* when used at concentrations >20 μM; when tested below this threshold, it similarly prevented apoptosis (Fig. 3B). Second, we assayed the amount of PGE_2 synthetized in U937 cells in the presence/absence of different concentrations of nimesulide, NS-398 or celecoxib. Fig. 3B shows that the low basal PGE_2 levels were not significantly affected by the incubation with the COX-2 inhibitors, even when they were used at the highest concentrations. Our results suggest that COX-2 even if expressed it is not enzymatically active in U937 cells.

Taken together, these results indicate differential abilities of COX-2 inhibitors in modulating intrinsic *vs.* extrinsic apoptotic pathways and strongly suggest that the protecting effect in stress-induced apoptosis is due to an off-target mechanism.

3.2. COX-2 inhibitors prevent stress-induced apoptosis by acting at the very early steps of the apoptotic signaling pathway

Next, we investigated at which step within the intrinsic apoptotic signaling cascade COX-2 inhibitors interfered in U937 cells. The induction of apoptosis by VP16 was chosen as a model. Moving backwards along the pathway [31], we found that the cleavage/activation of the effector caspase-9 was prevented (Fig. 4A); the same was observed for caspase-8, normally also

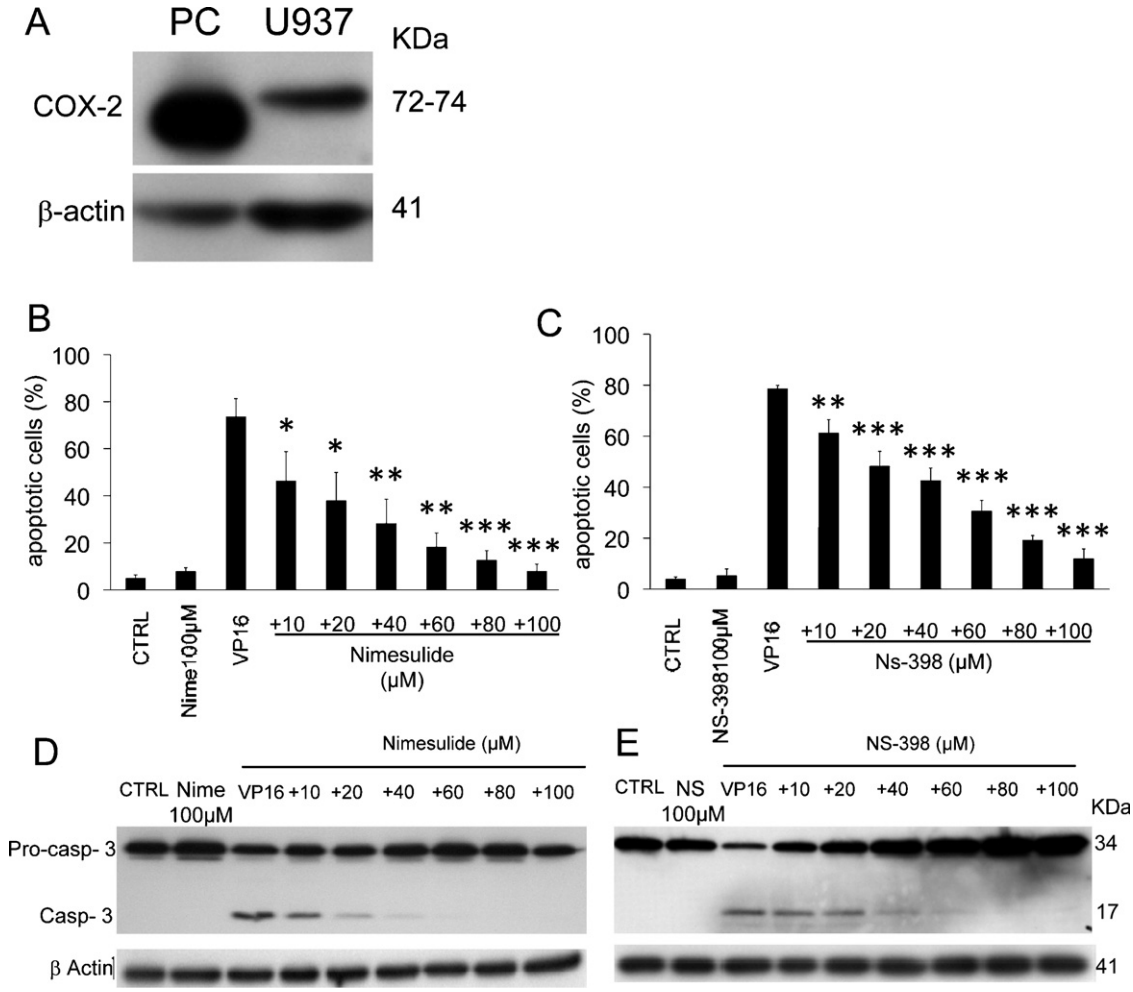


Fig. 1. COX-2 inhibitors prevent VP16-induced apoptosis in COX-2-positive U937 cells. (A) Assessment of COX-2 protein expression level in U937 cells (Western blot analysis). 20 μg of total protein extract was loaded along with 5 μg protein extracts of positive control (mouse macrophages stimulated with 10 ng/ml IFNγ/1 μg/ml LPS). One of three independent experiments with similar results is shown. Estimation of apoptosis by the analysis of nuclear morphology after Hoechst staining in U937 cells untreated or pre-treated for 24 h with 10–100 μM nimesulide (B) or NS-398 (C). Data represent the mean of five independent experiments ±SD. Significant difference compared to VP16-treated cells: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$. (D–E) Confirmation of the effects of COX-2 inhibitors on apoptosis by analysis of caspase-3 cleavage. One of three independent experiments was shown.

cleaved during VP16-triggered apoptosis (not shown) [32]. Therefore, we assessed the impact of COX-2 inhibitors on mitochondria by analyzing the mitochondrial membrane potential and the cytochrome *c* release. Both phenomena were inhibited in a dose-dependent manner (Fig. 4B and C). Similarly, the upstream activation of the two pro-apoptotic Bcl-2 family members Bax and Bak was impaired (Fig. 4D and supplemental Fig. 1).

Bax activation during apoptosis is a multi-step process, which includes translocation to mitochondria [33], an event that may be blocked even when Bax conformational change occurs. The pattern of intracellular distribution of Bax (independent of its activation status) appeared dotted in VP16-treated cells as expected [34], and overlapping with the mitochondrial protein COX IV (Fig. 5E), as the consequence of Bax re-localization to mitochondria [34]. The co-treatment with COX-2 inhibitors restored a diffuse pattern of Bax, comparable to control cells. The prevention of Bax/Bak functions is also not due to up-regulation of Bcl-2 anti-apoptotic members Bcl-2 or Bcl-xL (supplemental Fig. 2).

COX-2 inhibitors do not affect physiological stimuli (Fig. 2C). The mitochondrial pathway may be initiated downstream of caspase-8 activation [35] as part of an amplification signal. Thus, physiological stimuli like anti-Fas may lead to the activation of Bax and Bak, as a consequence of a cross talk occurring between the extrinsic and the intrinsic apoptotic pathway [36]. We investigated whether COX-2 inhibitors may affect the levels of Bax/Bak activation upon anti-Fas stimulation. Results show comparable levels of Bax and Bak activation in treated and untreated cells (supplemental Fig. 3). This finding also excludes direct modulations of Bax/Bak by COX-2 inhibitors and strongly suggests that COX-2 inhibitors act at very early steps of apoptotic signaling, likely at the commitment step.

3.3. COX-2 inhibitors prevented DNA damage and affected drug accumulation

The fact that COX-2 inhibitors specifically inhibit stress-induced apoptosis at very early steps may be the consequence of their ability to affect drug internalization or metabolism. This hypothesis may also explain why the apoptotic physiological stimuli, by acting on extracellular targets, are not affected. Accordingly, COX-2 inhibitors might reduce intracellular damage induced by chemotherapeutic agents as a consequence of their reduced intracellular availability. VP16 is a DNA damaging agent whose impact on DNA may be indirectly evaluated by histone H2A.x phosphorylation (γ-H2A.x) [37]. Fig. 5A (left panels) shows a typical time-course of H2A.x phosphorylation upon VP16

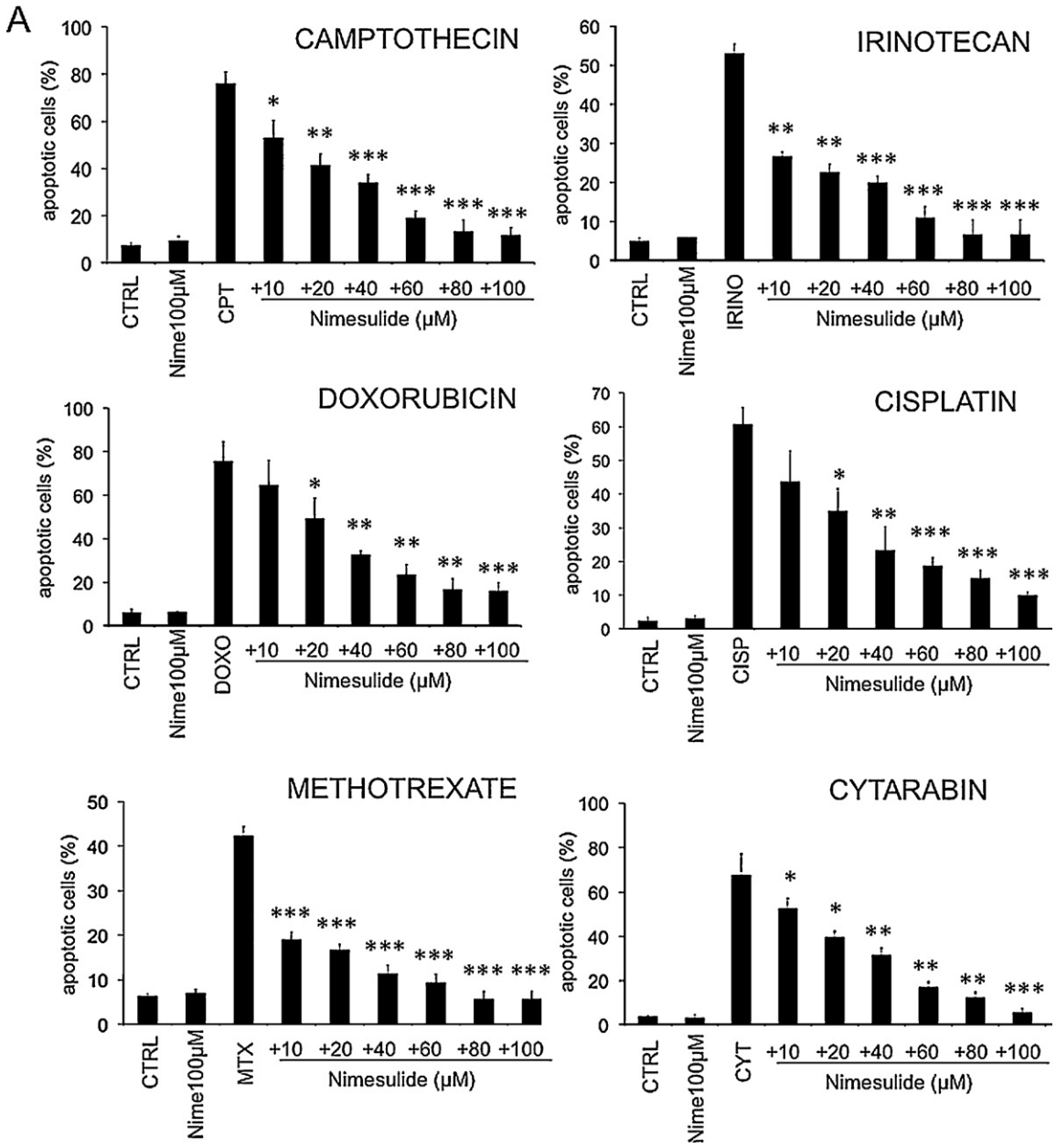


Fig. 2. Nimesulide protects U937 cells exclusively from stress-induced apoptosis. Effects of nimesulide on apoptosis induced by: (A) chemotherapeutic agents triggering the intrinsic apoptotic pathway: camptothecin (10 μM; CPT); irinotecan (10 μM; IRINO); doxorubicin (4 μM; DOXO); cisplatin (100 μM; CISP); methotrexate (20 μM; MTX); or cytarabine (10 μM; CYT) in combination with 0–100 μM nimesulide; (B) physiological stimuli: anti-FAS (50 ng/ml); TNFα (1 ng/ml) and TRAIL (0.5 μg/ml). The percentage of apoptotic cells was estimated by analysis of nuclear fragmentation. Data represent the mean of at least three independent experiments ±SD. Significant difference compared to VP16-treated cells: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$. Similar results achieved with NS-398 (not shown).

treatment. VP16-induced histone H2A.x phosphorylation was strongly prevented in the presence of nimesulide (Fig. 5A, right panels). The inhibition of γ-H2A.x accumulation continued even after longer incubation times with VP16, excluding the hypothesis that DNA damage was simply delayed. The impact of the other NSAIDs on VP16-induced DNA damage confirmed a similar pattern of modulation. Fig. 5B reports the quantification of cells positive to H2A.x phosphorylation in the control and in the pre-treated cells with each COX-2 inhibitor upon VP16 challenge.

Recently, the ability of celecoxib to modulate the drug importer CTR-1 was reported [21]. This inhibition counteracts the cytocidal activity of cisplatin in human esophageal squamous cancer cells [21]. Therefore, we assessed the ability of our panel of COX-2 inhibitors to modulate this carrier. Analysis by Western blot did not show any relevant impact on CTR-1 protein expression (Fig. 6A), thus excluding a relevant role in the phenomenon at least for this importer.

The anti-apoptotic effect of nimesulide is strongly limited when apoptosis is induced with the protein synthesis inhibitor puromycin in comparison to VP16 (supplemental Fig. 4). This result suggests that a neosynthesis, rather than a down-regulation, of protein factors may be implicated in effectively counteracting apoptosis.

Because one of the main reasons for chemotherapy failure is the exacerbation of events mediating drug efflux, we investigated if COX-2 inhibitors might promote drug extrusion. To address this question, we first performed a classical drug efflux assay based on the use of the fluorescent tool rhodamine 1,2,3 (Rh 123) [38] on U937 cells, either untreated or treated with 10, 40 or 100 μM of nimesulide or NS-398; alternatively, with 20 or 40 μM celecoxib. A consistent dose-dependent increase in drug efflux was observed

after nimesulide and NS-398 treatment, reaching maximum values

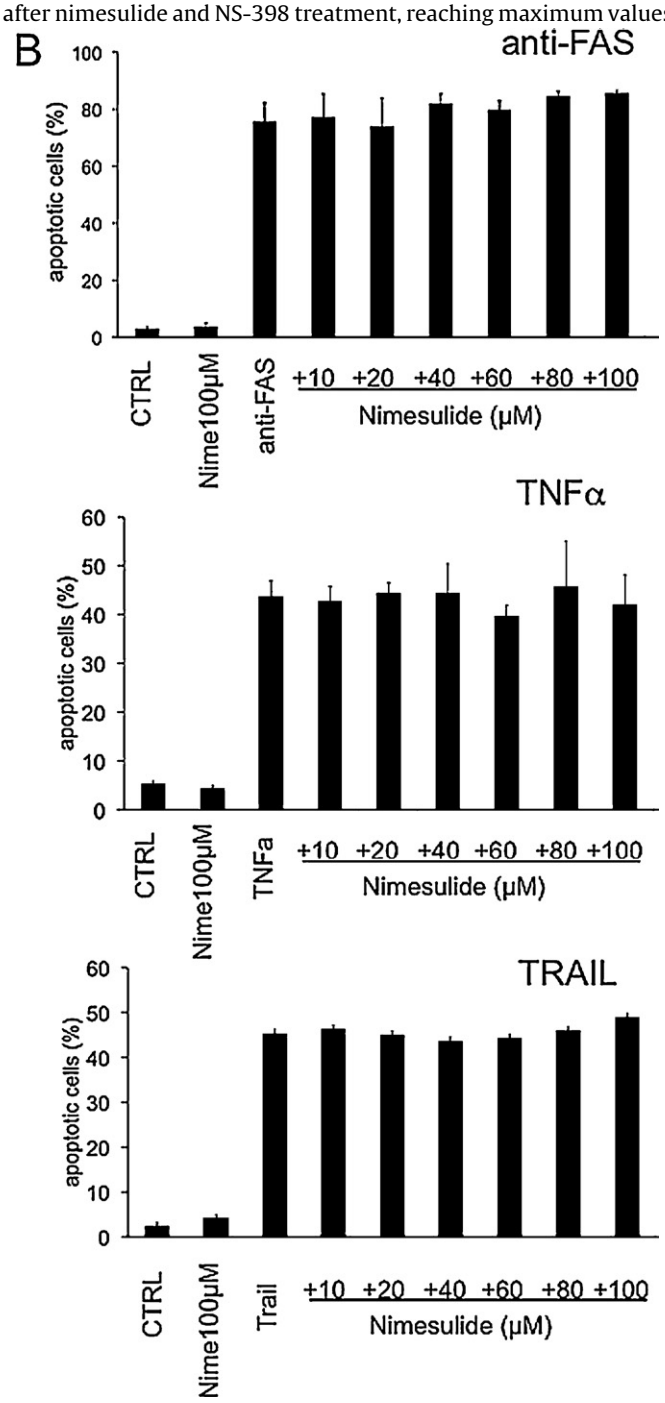


Fig. 2. (*Continued*).

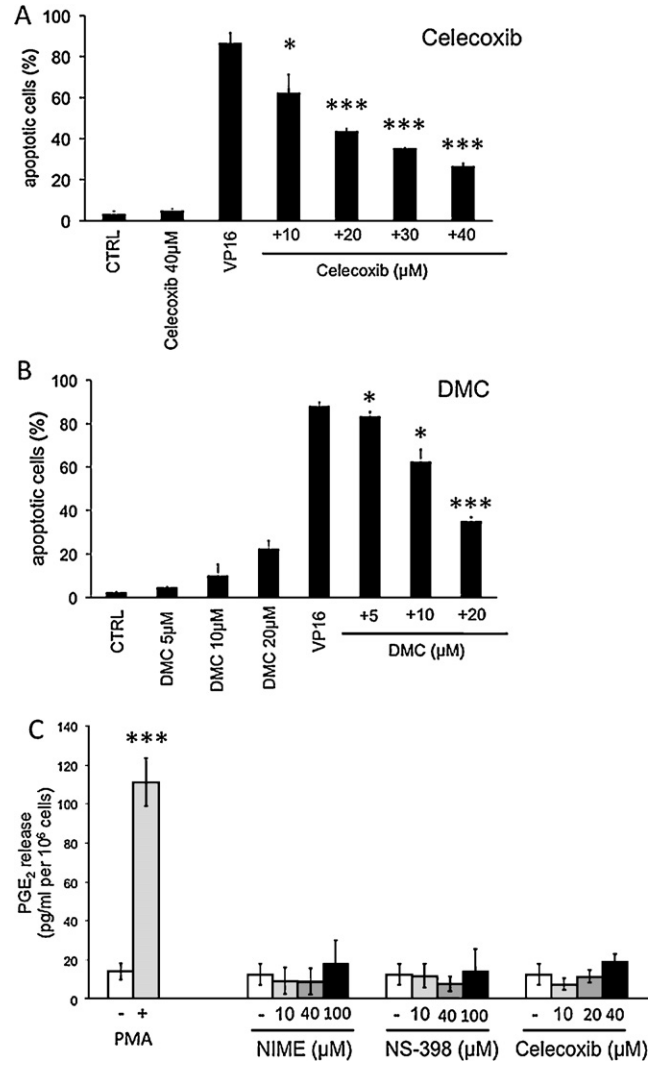
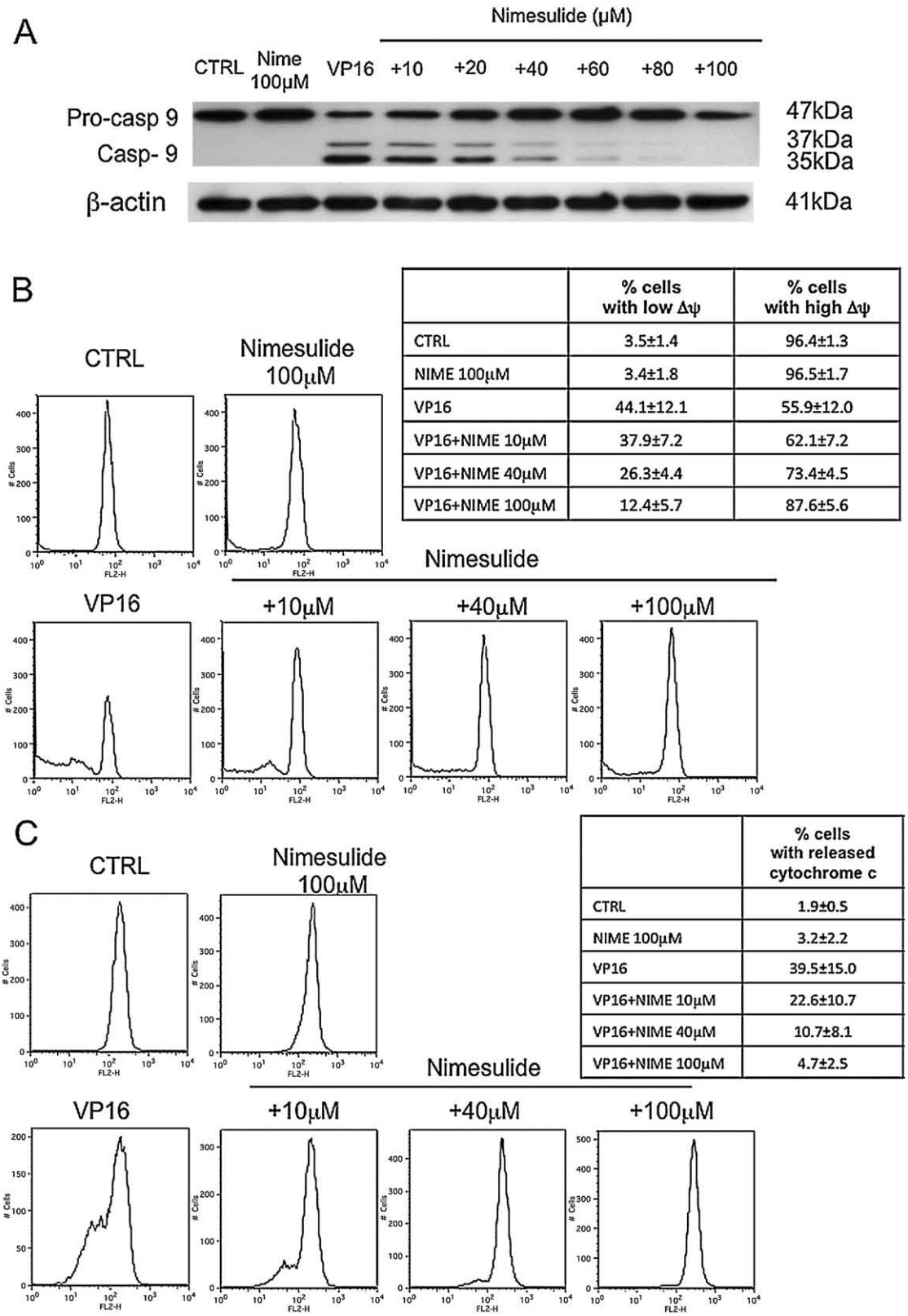


Fig. 3. The anti-apoptotic effect of COX-2 inhibitors is COX-independent. Estimation of percentage of apoptosis after Hoechst staining of U937 cells, either untreated or pre-treated 24 h with celecoxib (A) or DMC (B). Significant differences when compared to VP16-treated cells: $^{*}p < 0.05$, $^{***}p < 0.001$. (C) Quantification of PGE_2 levels from the supernatant of U937 cells incubated or not with the indicated concentrations of the nimesulide (NIME), NS-398 or celecoxib. The estimation of PGE_2 levels in K562 cells stimulated with PMA (see Section 2) was used as positive control (dashed column) in comparison to untreated K562 cells (first white column) and untreated U937 cells. PGE_2 is reported in pg/ml normalized for cell concentration (10^6 cells). Data are represented as the mean of four independent experiments ±SD.

of 45.80% ± 8.3 and 51.56% ± 6.60 reduction in fluorescence with 100 μM nimesulide or NS-398, and during the first 3 h of recovery, respectively (Fig. 6B). Celecoxib significantly increased drug efflux only at the concentration of 40 μM (14·6% ± 3.2 reduction), however at much lower values than those detected with nimesulide and NS-398. Next, we compared the expression levels of the most ubiquitous multidrug resistance proteins MDR-1 and MRP-1 [39,40] on the same cells. Supplemental Fig. 5B indicates a dose-dependent up-regulation at the mRNA levels for all the three different multi-drug carriers, with MDR-1 the most affected (MDR-1 = +3.09 ± 1.02, MRP-1 = +1.55 ± 0.25 with 100 μM nimesulide; MDR-1 = +3.83 ± 0.11, MRP-1 = +2.11 ± 0.11 with 100 μM NS-398). MDR-1 mRNA was also up-regulated by celecoxib in U937 cells (up to +34.74 ± 16.95 fold; supplemental Fig. 5C). However, the same analysis did not confirm any up-regulation of the corresponding protein (with MDR-1 paradoxically being even significantly decreased) (Fig. 6, panels C and D). These results indicate a differential ability of COX-2 inhibitors to impact drug efflux and exclude that these two main multidrug resistance proteins are implicated. Altogether, these findings exclude that drug efflux maybe the main mechanism responsible for the prevention of cell damage induced by chemotherapeutic agents.

3.4. The ability of COX-2 inhibitors to counteract stress-induced apoptosis ubiquitously occurs in different hematopoietic cancer cell lines

So far, we have assessed a general ability of COX-2 inhibitors to counteract stress-induced apoptosis in U937 cells. We wanted to determine if this effect was ubiquitous. With this purpose, we



	% cells with low Δψ	% cells with high Δψ
CTRL	3.5±1.4	96.4±1.3
NIME 100μM	3.4±1.8	96.5±1.7
VP16	44.1±12.1	55.9±12.0
VP16+NIME 10μM	37.9±7.2	62.1±7.2
VP16+NIME 40μM	26.3±4.4	73.4±4.5
VP16+NIME 100μM	12.4±5.7	87.6±5.6

	% cells with released cytochrome c
CTRL	1.9±0.5
NIME 100μM	3.2±2.2
VP16	39.5±15.0
VP16+NIME 10μM	22.6±10.7
VP16+NIME 40μM	10.7±8.1
VP16+NIME 100μM	4.7±2.5

Fig. 4. COX-2 inhibitors prevent stress-induced apoptosis prior to Bax activation. Evaluation of the impact of COX-2 inhibitors on: (A) caspase-9 cleavage; (B) mitochondrial membrane potential after incubation with MitoTracker Red (50 nM; MTR) and relative quantification of the percentage of cells with high/low MTR fluorescence (right panel); (C) cytochrome *c* release from mitochondria after immunostaining of U937 cells (right panel: quantification of the percentage of the cells with low mitochondrial cytochrome *c*); (D) Bax activation by VP16 in untreated *vs.* nimesulide-treated U937 cells (100 μM nimesulide chosen as a model), as assessed by fluorescence microscopy and FACS (right panels) analysis using antibodies specific for the active form of Bax (anti-Bax 6a7) in cells counterstained with Hoechst to allow visualization of the nuclear morphology; (E) the pattern of Bax localization on U937 cells on the same samples. Mitochondria was labeled with anti-COX IV antibody and Bax with anti-Bax Δ21. One of three independent experiments with similar results is shown.

Please cite this article in press as: Cerella C, et al. COX-2 inhibitors block chemotherapeutic agent-induced apoptosis prior to commitment in hematopoietic cancer cells. Biochem Pharmacol (2011), doi:10.1016/j.bcp.2011.06.028

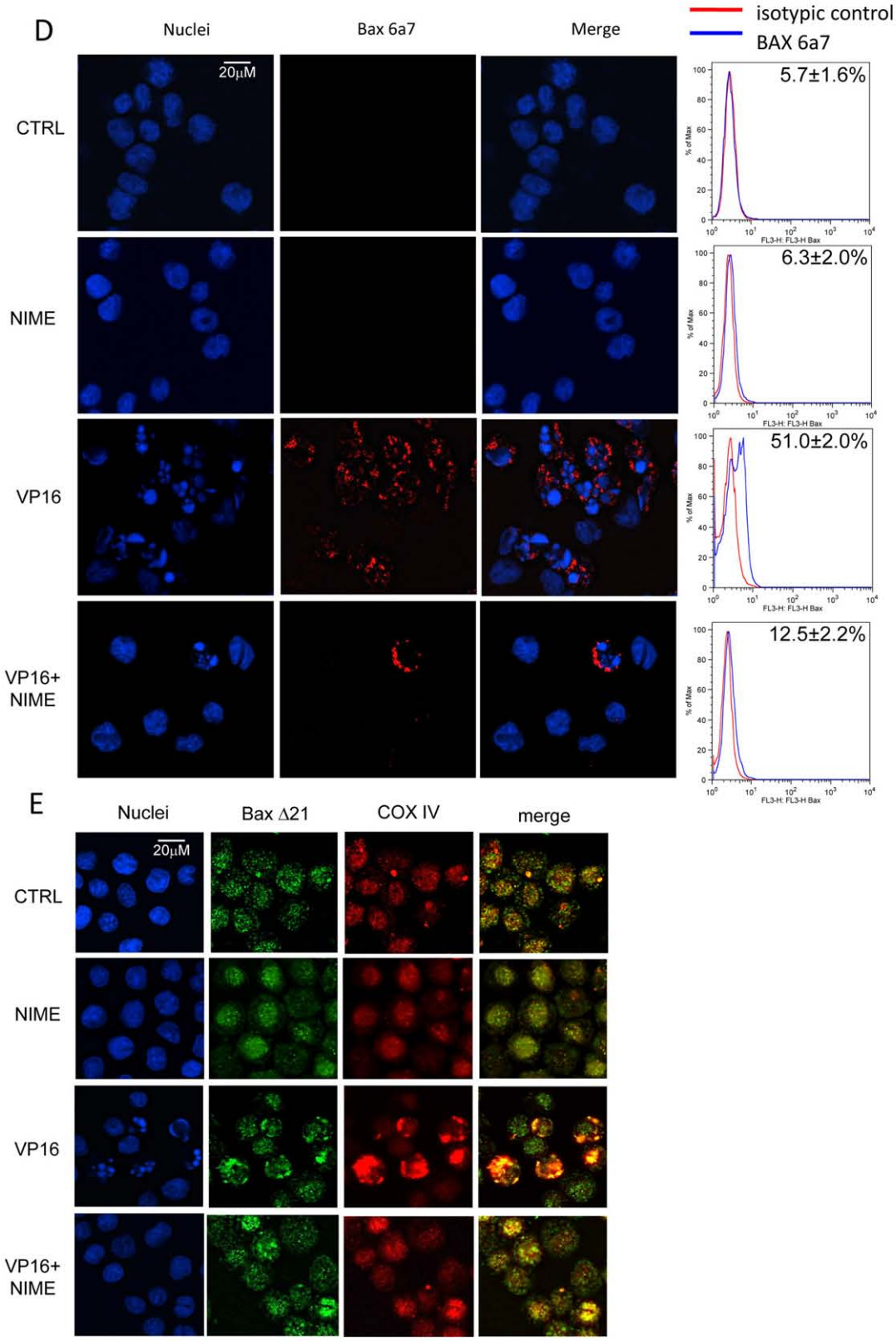


Fig. 4. (*Continued*).

extended our investigations to a panel of hematopoietic cell lines, selecting different models, heterogeneous for COX-2 protein expression levels and origins (Fig. 7A; see also Section 2). Fig. 7B documents the effects of nimesulide and celecoxib on apoptosis induced by cisplatin (an agent which efficiently impacted the viability of all the panel of cell lines tested). Nimesulide prevented apoptosis in all the cell lines, with the exception of K562 cells. Celecoxib always inhibited apoptosis.

These results confirm that anti-apoptotic potential of COX-2 inhibitors; moreover, looking at the differential levels of COX-2 protein expression (Fig. 7A), it provides further evidence that COX-2 enzyme is not implicated in this modulatory effect.

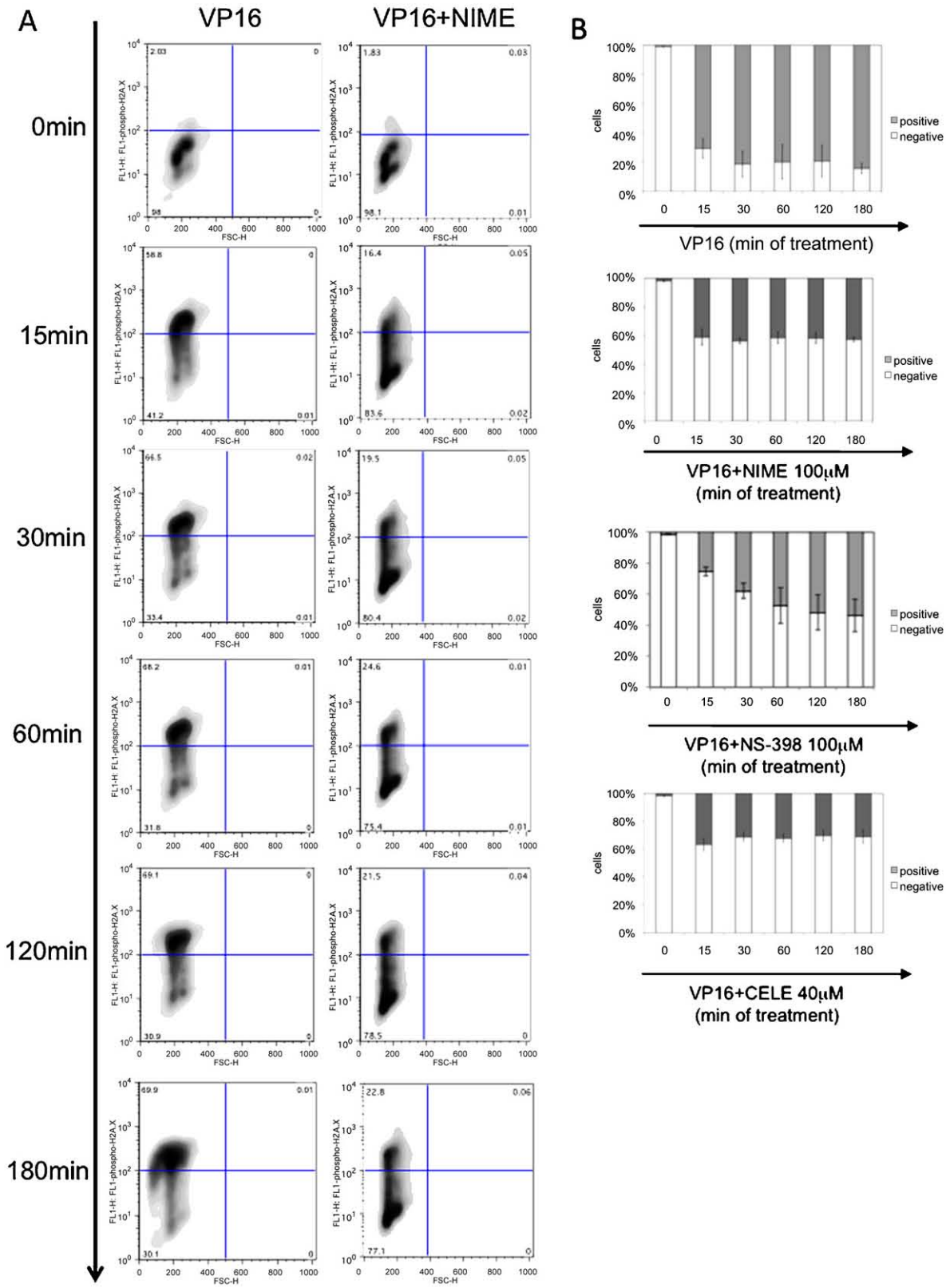


Fig. 5. COX-2 inhibitors prevent etoposide-induced DNA damage. Time-course analysis of the impact of nimesulide (100 μM), NS-398 (100 μM) and celecoxib (40 μM) on the ability of VP16 to induce DNA-damage based on the detection of the phosphorylation of the histone H2A.x (γH2A.x). (A) Typical bi-parametric analysis of anti-γH2A.x *vs.* Forward Side Scatter (FSC-H) of VP16-treated (first column) *vs.* VP16 + nimesulide-treated (VP16 + NIME) U937 cells (second column). (B) Quantification of γH2A.x-positive *vs.* negative cells in either control cells or treated with nimesulide, NS-398 or celecoxib. The results are the mean of three independent experiments ±SD.

4. Discussion

In this study, we report that three different COX-2 inhibitors (nimesulide, NS-398 and celecoxib) efficiently counteract the apoptogenic activity of a broad panel of anti-cancer agents, which are currently used in clinics. The preventive effect specifically concerns compounds that trigger the intrinsic apoptotic signaling. In contrast, COX-2 inhibitors do not exert any modulatory effect on

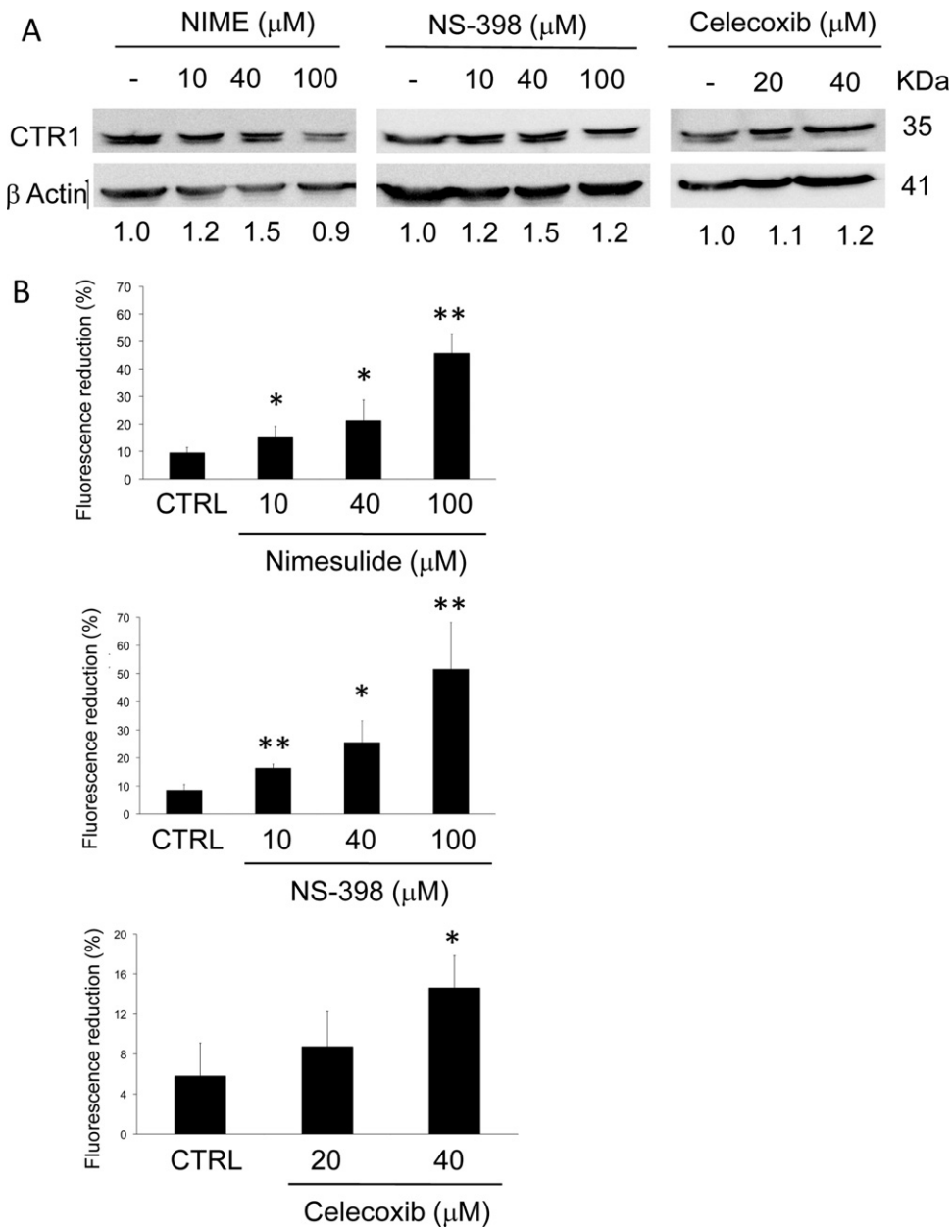


Fig. 6. Impact of COX-2 inhibitors on drug efflux and chemoresistance protein expression in U937 cells. (A) Evaluation of the impact of COX-2 inhibitors on the protein expression of the importer CTR-1. One of two independent experiments is shown. (B) Drug efflux assay based on the use of the fluorescent tool rhodamine 1,2,3 (Rh 123) in the presence/absence of the indicated concentrations of nimesulide (first row), NS-398 (second row) or celecoxib (third row). Estimation of Rh 123 fluorescence by FACS analysis immediately after Rh 123 removal ($T = 0$ h) or after 3 h of recovery ($T = 3$ h). COX-2 inhibitors were re-added during the recovery. Estimation of the percentage of the fluorescence reduction detected in untreated *vs.* treated cells (bottom panels). Analysis of expression of MDR-1 (A) and MRP-1 (B) multi-drug resistance proteins after 24 h of incubation with the reported concentrations of COX-2 inhibitors. Data correspond to three independent experiments ± SD. Significant differences when compared to control cells are: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

apoptosis induced by extracellular ligands (anti-Fas, TNFα and Trail). The intrinsic apoptotic cascade is inhibited at very early steps, prior to Bax/Bak activation. Moreover, etoposide, used as a tool to monitor the ability of chemotherapeutic agents to trigger cell damage, documents that COX-2 inhibitors strongly attenuate the generation of the apoptogenic stress.

Our results show that COX-2 inhibitors affect only the activity of stress-inducing agents. This is not the consequence of a differential modulation of the intrinsic *vs.* extrinsic apoptotic pathways. On one hand, we may only witness the prevention of the apoptotic signaling cascade without detecting any specific alterations of modulators of the intrinsic pathway. On the other hand, remarkably, the apoptogenic potential of H_2O_2, a robust oxidative agent that triggers a typical stress-induced apoptosis, exactly as found for physiological stimuli, is not affected by COX-2 inhibitors (see supplemental Fig. 6). The prevention of apoptosis is a real rescue from death and not simply a delay of apoptotic signaling. COX-2 inhibitors, indeed, prevent DNA damage induced by etoposide. This finding implies that COX-2 inhibitors act very upstream, prior to the commitment to apoptosis, because the damaging stress induced by chemotherapeutic agents (the apoptogenic stimulus thus) may be avoided.

The anti-apoptotic effect of COX-2 inhibitors reported in this study refers to 24 h of pre-treatment with the COX-2 inhibitors. We have further ascertained that the maximal anti-apoptotic effect of COX-2 inhibitors (as observed after 24 h) reaches the protection

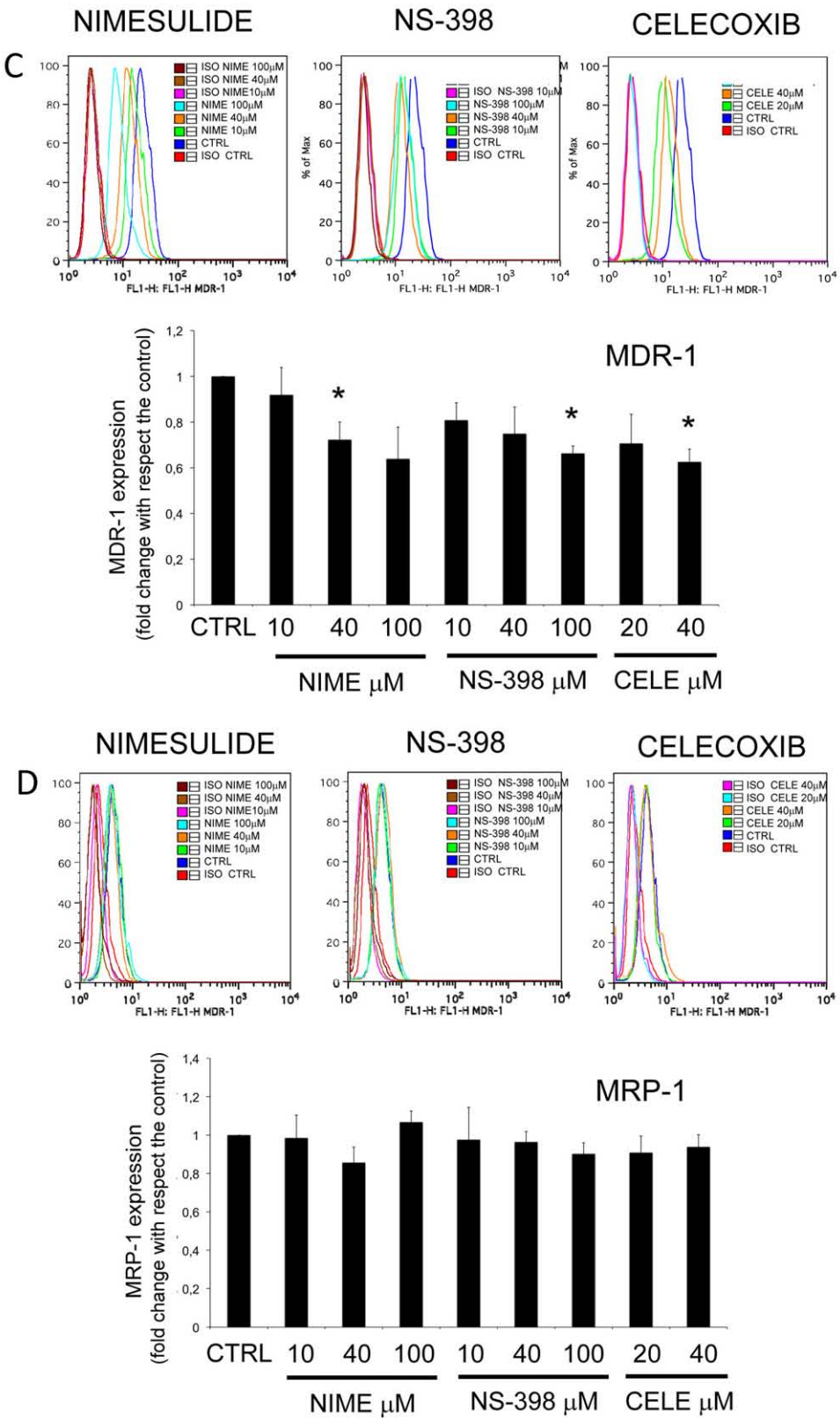


Fig. 6. (*Continued*).

plateau within 9 h of pre-treatment (supplemental Fig. 7). Cancer cells may develop different chemoresistance strategies to modulate the intracellular concentration of anti-cancer drugs [39,41]. They may up-regulate specific protein carriers, which mediate the extrusion of xenobiotics to the extracellular compartment. Conversely, they may show a decreased expression of protein importers limiting the internalization of chemotherapeutic agents. Finally, they may exacerbate specific intracellular systems relying on drug metabolizing enzymes minimizing their biological activities. Eventually these events reduce the intracellular

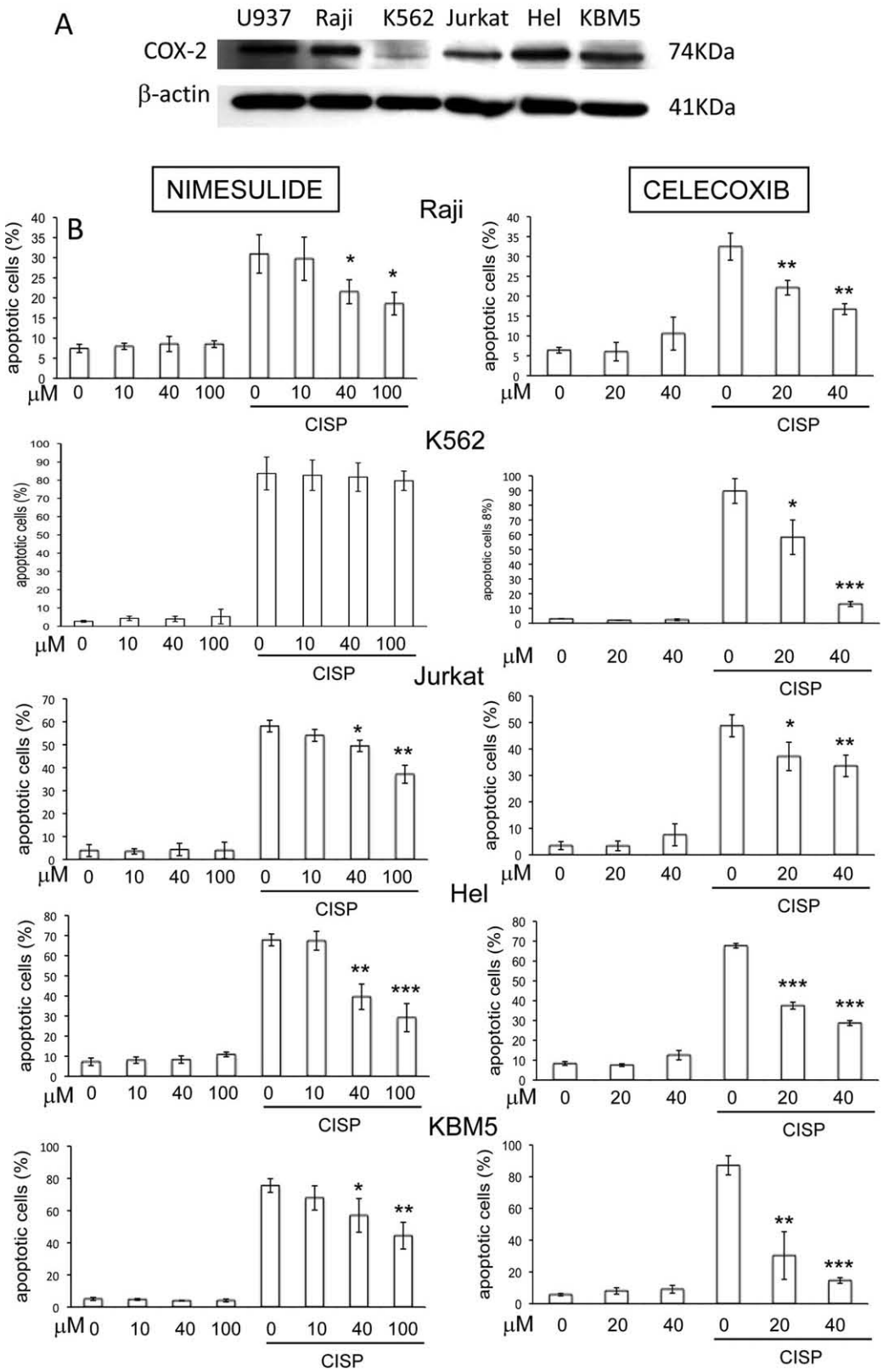


Fig. 7. COX-2 inhibitors exert anti-apoptotic effects in a broad panel of hematopoietic cancer cell lines. (A) COX-2 protein expression levels in a panel of hematopoietic cell lines (comparison with U937 cells, first band on the left) by Western blot analysis. (B) Estimation of apoptosis as assessed by analysis of the mitochondrial membrane potential loss with MTR, untreated or pre-treated 24 h with the indicated concentrations of nimesulide (first column) or celecoxib (second column). Results were confirmed by analysis of nuclear morphology after Hoechst staining (data not shown). Mean of three independent experiments ±SD. Significant differences when compared to VP16-treated cells: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

concentration of active chemotherapeutic agents below the apoptogenic threshold [39,41].

We have explored the ability of COX-2 inhibitors to modulate drug accumulation. We have found that the incubation of the cells with nimesulide and NS-398 reduces the intracellular accumulation of Rh 123, a fluorescent tool commonly used to evaluate chemoresistance due to enhanced drug efflux towards the extracellular environment [42]. However, we did not confirm the same ability for celecoxib, which very mildly affects drug efflux only at the highest concentration. Besides, when we examined the expression of the two most ubiquitously up-regulated multidrug resistance proteins in cancer cells, MDR-1 and MRP-1, we could not find any protein up-regulation, although their mRNA levels were paradoxically strongly increased, even in the case of nimesulide and NS-398. These findings do not support the hypothesis that an exacerbated phenomenon of drug extrusion may be generally responsible for the inhibition of apoptosis by COX-2 inhibitors. Similarly, initial data does not support the fact that reduced drug import may be implicated. COX-2 inhibitors appear less effective in protecting cells from apoptosis induced with puromycin, a protein synthesis inhibitor (supplemental Fig. 4). These findings suggest that the neosynthesis, rather than a down-regulation, of proteins is implicated; moreover, they indicate that the up-regulation is a reversible event. Besides, we did not observe any modulation of CTR-1 protein (importing chemotherapeutic agents including cisplatin [43]), which has been previously found up-regulated by celecoxib [21]. However, further investigations are required to exclude that other importers may be involved. Moreover, other mechanisms may also be potentially implicated. Amongst them, we may consider regulation of phases I and II drug metabolism [44]. In this context, good candidates for investigation are the superfamily of the cytochromes P450 (CYPs) [45,46] and the group of glutathione *S*-transferases (GST) [47].

COX-2 inhibitors may produce their effects dependent on or independent of the COX-2 enzyme. The evidence we collected are in favor of an off-target effect. We demonstrate here that the low basal PGE_2 production in U937 cells, our main cell model, is not modulated by the incubation with COX-2 inhibitors, even when they are used at very high concentrations; in addition, the non active analog of celecoxib, 2,5-dimethyl celecoxib [30], is similarly able to protect cells against apoptosis. The anti-apoptotic potential of COX-2 inhibitors is not limited to a specific cell type, since different hematopoietic cancer cell models appear similarly modulated. The panel of selected hematopoietic cell lines investigated is heterogeneous for biological characteristics as well as for COX-2 protein expression. The fact that COX-2 inhibitors, nevertheless, generally counteract apoptosis reinforces our evidence that the phenomenon is unrelated to COX-2 enzyme inhibition. Besides, it implies that the anti-apoptotic potential of COX-2 inhibitors is ubiquitous; however the current lack of a general target makes also impossible to predict which cells might be mostly sensitive.

A very recent study showed an ability of celecoxib to down-regulate an importer specific for cisplatin in an adherent cancer cell model [21]. Taken together, our and other findings encourage speculation that COX-2 inhibitors, in opposition to previous reports, may exert anti-apoptotic effects in a large and heterogeneous group of cancers where the exacerbation of various chemoresistance-related phenomena plays a determining role.

The mean blood concentration of nimesulide is estimated as 20 μM (6 μg/μl) after administration of 100 mg nimesulide, with peaks of 37.6 μM (11.6 μg/μl) after one week of treatment [48]. These values refer to the intake of the compound for anti-inflammatory purposes taking into account the plasma proteins binding. However, at the sites of inflammation the effective concentration is expected to be higher, as observed for other compounds normally bound by albumin, due to the lower pH [49]. In our hands, the anti-apoptotic effect of nimesulide is already significant from a minimum concentration of 10 μM (in presence of 10% FCS), thus in the range of therapeutic concentrations. Subjects exposed to chemotherapeutic protocols typically develop inflammatory conditions as a consequence of macrophage engulfment. Thus, it is conceivable that the effective concentration of these compounds in the tumor microenvironment may even be higher. Besides, different COX-2 inhibitors are currently under investigation for anti-cancer strategies. In this instance, the administration of higher concentrations is under evaluation. At the light of these considerations, the administration of these anti-inflammatory agents in association with chemotherapeutic agents should be carefully re-evaluated.

Acknowledgments

C.C., M.S., S.C. are recipients of postdoctoral Télévie grants and C.S. is a recipient of a doctoral Télévie grant. Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer is supported by the "Recherche Cancer et Sang" foundation, by the "Recherches Scientifiques Luxembourg" association, by "Een Haerz fir kriibskrank Kanner" association, by the Action Lions "Vaincre le Cancer" association and by Télévie Luxembourg. The authors acknowledge Dr. Lina Ghibelli, Dr. Simone Fulda and Dr. Guido Kroemer for their helpful discussions. Editing and print costs are covered by the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bcp.2011.06.028.

References

[1] Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. Int J Cell Biol 2010;2010:215158.
[2] Cerella C, Sobolewski C, Dicato M, Diederich M. Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. Biochem Pharmacol 2010;80:1801–15.
[3] Surh YJ, Kundu JK. Signal transduction network leading to COX-2 induction: a road map in search of cancer chemopreventives. Arch Pharm Res 2005;28:1–15.
[4] Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. Pharmacol Rep 2010;62:233–44.
[5] Sinha-Datta U, Taylor JM, Brown M, Nicot C. Celecoxib disrupts the canonical apoptotic network in HTLV-I cells through activation of Bax and inhibition of PKB/Akt. Apoptosis 2008;13:33–40.
[6] Wu KK, Liou JY. Cyclooxygenase inhibitors induce colon cancer cell apoptosis Via PPARdelta –> 14-3-3epsilon pathway. Methods Mol Biol 2009;512:295–307.
[7] Jana NR. NSAIDs and apoptosis. Cell Mol Life Sci 2008;65:1295–301.
[8] Totzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition. Oncogene 2003;22:8021–30.
[9] Che SM, Zhang XZ, Hou L, Song TB. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 enhances radiosensitivity of radioresistant esophageal cancer cells by inhibiting AKT activation and inducing apoptosis. Cancer Invest 2010;28:679–88.
[10] O'Kane SL, Eagle GL, Greenman J, Lind MJ, Cawkwell L. COX-2 specific inhibitors enhance the cytotoxic effects of pemetrexed in mesothelioma cell lines. Lung Cancer 2010;67:160–5.
[11] Kaneko M, Kaneko S, Suzuki K. Prolonged low-dose administration of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib enhances the antitumor activity of irinotecan against neuroblastoma xenografts. Cancer Sci 2009;100:2193–201.
[12] Yamanaka Y, Shiraki K, Inoue T, Miyashita K, Fuke H, Yamaguchi Y, et al. COX-2 inhibitors sensitize human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. Int J Mol Med 2006;18:41–7.
[13] Martin S, Phillips DC, Szekely-Szucs K, Elghazi L, Desmots F, Houghton JA. Cyclooxygenase-2 inhibition sensitizes human colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through clustering of DR5 and concentrating death-inducing signaling complex components into ceramide-enriched caveolae. Cancer Res 2005;65:11447–58.

[14] Saikawa Y, Sugiura T, Toriumi F, Kubota T, Suganuma K, Isshiki S, et al. Cyclooxygenase-2 gene induction causes CDDP resistance in colon cancer cell line, HCT-15. Anticancer Res 2004;24:2723–8.
[15] Xia W, Zhao T, Lv J, Xu S, Shi J, Wang S, et al. Celecoxib enhanced the sensitivity of cancer cells to anticancer drugs by inhibition of the expression of P-glycoprotein through a COX-2-independent manner. J Cell Biochem 2009;108: 181–94.
[16] Rudner J, Elsaesser SJ, Muller AC, Belka C, Jendrossek V. Differential effects of anti-apoptotic Bcl-2 family members Mcl-1. Bcl-2, and Bcl-xL on celecoxib-induced apoptosis. Biochem Pharmacol 2010;79:10–20.
[17] He Q, Luo X, Jin W, Huang Y, Reddy MV, Reddy EP, et al. Celecoxib and a novel COX-2 inhibitor ON09310 upregulate death receptor 5 expression via GADD153/CHOP. Oncogene 2008;27:2656–60.
[18] Agarwal B, Swaroop P, Protiva P, Raj SV, Shirin H, Holt PR. Cox-2 is needed but not sufficient for apoptosis induced by Cox-2 selective inhibitors in colon cancer cells. Apoptosis 2003;8:649–54.
[19] Liu H, Huang P, Xu X, Liu J, Guo C. Anticancer effect of celecoxib via COX-2 dependent and independent mechanisms in human gastric cancers cells. Dig Dis Sci 2009;54:1418–24.
[20] Elrod HA, Yue P, Khuri FR, Sun SY. Celecoxib antagonizes perifosine's anticancer activity involving a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. Mol Cancer Ther 2009;8:2575–85.
[21] Yu L, Chen M, Li Z, Wen J, Fu J, Guo D, et al. Celecoxib antagonizes the cytotoxicity of cisplatin in human esophageal squamous cell carcinoma cells by reducing intracellular cisplatin accumulation. Mol Pharmacol 2010.
[22] Nakanishi Y, Kamijo R, Takizawa K, Hatori M, Nagumo M. Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukaemia cell lines. Eur J Cancer 2001;37:1570–8.
[23] Secchiero P, Barbarotto E, Gonelli A, Tiribelli M, Zerbinati C, Celeghini C, et al. Potential pathogenetic implications of cyclooxygenase-2 overexpression in B chronic lymphoid leukemia cells. Am J Pathol 2005;167:1599–607.
[24] Cerella C, Scherer C, Cristofanon S, Henry E, Anwar A, Busch C, et al. Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (Al_2S_4). Apoptosis 2009;14:641–54.
[25] Chateauvieux S, Eifes S, Morceau F, Grigorakaki C, Schnekenburger M, Henry E, et al. Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway. Biochem Pharmacol 2011;81:498–509.
[26] Waterhouse NJ, Trapani JA. A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells. Cell Death Differ 2003;10:853–5.
[27] Henshall DC, Araki T, Schindler CK, Lan JQ, Tiekoter KL, Taki W, et al. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. J Neurosci 2002;22:8458–65.
[28] Smart DJ, Halicka HD, Schmuck G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Williams GM. Assessment of DNA double-strand breaks and gammaH2AX induced by the topoisomerase II poisons etoposide and mitoxantrone. Mutat Res 2008;641:43–7.
[29] Kang CD, Han CS, Kim KW, Do IR, Kim CM, Kim SH, et al. Activation of NF-kappaB mediates the PMA-induced differentiation of K562 cells. Cancer Lett 1998;132:99–106.
[30] Schonthal AH, Chen TC, Hofman FM, Louie SG, Petasis NA. Celecoxib analogs that lack COX-2 inhibitory function: preclinical development of novel anticancer drugs. Expert Opin Invest Drugs 2008;17:197–208.
[31] Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. Oncogene 2006;25:4798–811.
[32] Boesen-de Cock JG, de Vries E, Williams GT, Borst J. The anti-cancer drug etoposide can induce caspase-8 processing and apoptosis in the absence of CD95 receptor-ligand interaction. Apoptosis 1998;3:17–25.
[33] Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. J Cell Biol 1997;139:1281–92.
[34] D'Alessio M, De Nicola M, Coppola S, Gualandi G, Pugliese L, Cerella C, et al. Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis. FASEB J 2005;19:1504–6.
[35] Schumacher M, Cerella C, Eifes S, Chateauvieux S, Morceau F, Jaspars M, et al. Heteronemin, a spongean sesterterpene, inhibits TNF alpha-induced NF-kappa B activation through proteasome inhibition and induces apoptotic cell death. Biochem Pharmacol 2010;79:610–22.
[36] Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. Nature 1999;400:886–91.
[37] Crowe SL, Movsesyan VA, Jorgensen TJ, Kondratyev A. Rapid phosphorylation of histone H2A.x. Following ionotropic glutamate receptor activation. Eur J Neurosci 2006;23:2351–61.
[38] Webb M, Raphael CL, Asbahr H, Erber WN, Meyer BF. The detection of rhodamine 123 efflux at low levels of drug resistance. Br J Haematol 1996;93:650–5.
[39] Bodo A, Bakos E, Szeri F, Varadi A, Sarkadi B. The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. Toxicol Lett 2003;140–141: 133–43.
[40] Kruh GD, Belinsky MG. The MRP. Family of drug efflux pumps. Oncogene 2003;22:7537–52.
[41] Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. Med Princ Pract 2005;14(Suppl. 1):35–48.
[42] Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. Cell 1991;66:85–94.
[43] Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:14298–302.
[44] Michael M, Doherty MM. Drug metabolism by tumours: its nature, relevance and therapeutic implications. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2007;3: 783–803.
[45] Grant R, Ironside JW. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 detoxifying enzyme distribution in human cerebral glioma. J Neurooncol 1995;25:1–7.
[46] Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. Oncogene 2006;25:1679–91.
[47] Sau A, Pellizzari Tregno F, Valentino F, Federici G, Caccuri AM. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. Arch Biochem Biophys 2010;500:116–22.
[48] Bennett A, Villa G. Nimesulide: an NSAID that preferentially inhibits COX-2, and has various unique pharmacological activities. Expert Opin Pharmacother 2000;1:277–86.
[49] Bunczak-Reeh MA, Hargreaves KM. Effect of inflammation on the delivery of drugs to dental pulp. J Endod 1998;24:822–5.

Please cite this article in press as: Cerella C, et al. COX-2 inhibitors block chemotherapeutic agent-induced apoptosis prior to commitment in hematopoietic cancer cells. Biochem Pharmacol (2011), doi:10.1016/j.bcp.2011.06.028

Hindawi Publishing Corporation
International Journal of Cell Biology
Volume 2010, Article ID 215158, 21 pages
doi:10.1155/2010/215158

Review Article

The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies

Cyril Sobolewski,[1] Claudia Cerella,[1] Mario Dicato,[1] Lina Ghibelli,[2] and Marc Diederich[1]

[1] *Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg*
[2] *Dipartimento di Biologia, Università di Roma di Roma Tor Vergata, Via Ricerca Scientifica snc, 00133 Rome, Italy*

Correspondence should be addressed to Marc Diederich, marc.diederich@lbmcc.lu

Received 16 July 2009; Accepted 18 December 2009

Academic Editor: Simone Fulda

Copyright © 2010 Cyril Sobolewski et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

It is well admitted that the link between chronic inflammation and cancer involves cytokines and mediators of inflammatory pathways, which act during the different steps of tumorigenesis. The cyclooxygenases (COXs) are a family of enzymes, which catalyze the rate-limiting step of prostaglandin biosynthesis. This family contains three members: ubiquitously expressed COX-1, which is involved in homeostasis; the inducible COX-2 isoform, which is upregulated during both inflammation and cancer; and COX-3, expressed in brain and spinal cord, whose functions remain to be elucidated. COX-2 was described to modulate cell proliferation and apoptosis mainly in solid tumors, that is, colorectal, breast, and prostate cancers, and, more recently, in hematological malignancies. These findings prompt us to analyze here the effects of a combination of COX-2 inhibitors together with different clinically used therapeutic strategies in order to further improve the efficiency of future anticancer treatments. COX-2 modulation is a promising field investigated by many research groups.

1. Introduction: Inflammation and Cancer are Linked

Inflammation is the major reaction of natural immunity with the goal to defend the organism against pathogens. It can be induced upon bacterial infections by compounds including lipopolysaccharides, as well as by viruses, which are detected by Toll-like receptors (TLRs), expressed by immune cells like macrophages. Besides, inflammation can be triggered by physical injuries (i.e., UV) or chemical compounds (i.e., reactive oxygen species) [1]. The activation of specific receptors triggers intracellular signals (i.e., NFκB, p38, or MAPKs-mediated), which regulate pro-inflammatory cytokine expression, such as interleukin 1 beta (IL1β), tumor necrosis factor alpha (TNFα), interleukin 6 (Il6), together with chemokines and cell adhesion proteins [1], in turn, leading to the recruitment and the activation of immune cells.

Several diseases are associated to chronic inflammation, such as osteoarthritis, Crohn's disease, and cancer [2]. Although the first evidence of a connection between inflammation and cancer dates back to more than a century ago [3], only recently, this link has been further investigated, thus evidencing that the incidence of several cancers is tightly associated to inflammation such as colon, breast, and prostate cancers [4–6]. This hypothesis is supported by the findings that the tumor microenvironment is characterized by the infiltration with different types of immune cells (*i.e.*, dendritic cells, lymphocytes, and macrophages) responsible for the release of cytokines [1]. The role of these cytokines in tumor incidence has been established in many studies. For example, the overexpression of TNFα in transgenic mice bearing a lung tumor is associated with an increase of the size of the tumor [7]. Moreover, a chronic intake of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) leads to a significant reduction in the incidence of such tumors. Colorectal cancer (CRC), which remains an important cause of death in the industrialized world, is one of the most characterized types of tumor that benefits from treatment by NSAIDs [8]. Interestingly, chronic use of aspirin is reported to reduce the relative risk of CRC by about 50% [9]. Familial adenomatous polyposis, an inherited form of colon cancer, is characterized by the development of preneoplastic polyps.

At the molecular level, this disease is caused with a mutation of a tumor suppressor gene called Adenomatous polyposis coli (APC). It has been shown that the use of NSAIDs, like sulindac, as a chemopreventive treatment, is able to decrease the incidence of polyp formation [10]. Similar results were obtained with celecoxib [11], which is now approved by the Food and Drug Administration's Oncologic Drugs Advisory Committee as an adjuvant in FAP therapy.

A body of evidence indicates a role for inflammation in the development/modulation of different steps of cancer progression. Inflammation may play a role in tumor initiation by triggering the production of reactive oxygen species (ROS), responsible for DNA damage, thus increasing the rate of mutations [12]. It may also be implicated in tumor promotion, where inflammation triggers the secretion of growth factors, such as the epithelial (EGF) and fibroblast growth factors (FGF). These, in turn, favor the proliferation of initiated tumor cells by determining an imbalance between cell proliferation and cell death stimuli [6], due to the activation of different cell survival pathways [7].

Besides, the different cytokines produced during inflammation (*i.e.*, TNFα, IL1β, IL6, and IL8) can also activate several survival pathways, thus leading to an escape of tumor cells from cell death. Well known is the case of TNFα, produced by tumor and immune cells, which leads to the survival of cancer cells by the upregulation of antiapoptotic proteins, that is, Bcl-2 [13–15], *via* the activation of the nuclear factor kappa B (NFκB) [16]. The modulation of pro-survival pathways or anti-apoptotic proteins makes the expression/activation of such proinflammatory mediators also a determining factor in chemoresistance. A constitutive activation of such proinflammatory factors has been frequently found in many cancers, such as hepatocellular carcinoma [17], prostate cancer [18], as well as chronic and acute myeloid leukemia [19], where it is frequently associated with a bad prognosis. In these instances, the modulation of Bcl-2 anti-apoptotic family members has been frequently shown [13–15, 20].

Amongst the different mediators of inflammation, the cyclooxygenases (COXs) clearly appear to be implicated in cancer. This review focuses on COX-2, the inducible form, normally induced and implicated in inflammation, and intends to analyze what is currently known about the link between COX-2 and cancer, in terms of effects on cell proliferation and cell death. In this view, we will focus our attention on studies analyzing the effects of COX-2 inhibitors on cancer cells, when used alone as well as in combination with therapeutic approaches, including radiotherapy, chemotherapeutic agents, and photodynamic therapy. Finally, we will consider the relevance of COX-2-independent effects.

2. The Cyclooxygenase Enzyme Family

Cyclooxygenases (or prostaglandin H synthases), commonly referred to as COXs, are a family of myeloperoxidases located at the luminal side of the endoplasmic reticulum and nuclear membrane [21], which catalyze the rate-limiting step of prostaglandin biosynthesis from arachidonic acid [21]. These enzymes act by two coupled reactions. The first one is the conversion of arachidonic acid released from the plasma membrane by phospholipase A2 to prostaglandin G2 by the cyclooxygenase activity. The second reaction is mediated by the peroxidase activity and leads to the conversion of prostaglandin G2 to prostaglandin H2. Then, different synthases convert prostaglandin H2 to prostaglandin D2, F2α, E2, I2, and thromboxane A2 (Figure 1).

Prostanoids (prostaglandins and thromboxanes) are immediately released from the cells, where it is believed that they act locally in an autocrine and paracrine manner through different receptors activating different intracellular pathways still to be completely elucidated (Figure 1) [22]. Prostaglandins, specifically, are important for physiological functions like vasodilatation (PGD2, PGE2, PGI2), gastric cytoprotection (PGI2), maintenance of renal homeostasis, and platelet aggregation. Besides, prostaglandins play a major role in mediating fever (PGE2), pain sensitivity, and inflammation [21].

So far, three isoforms of COXs have been identified. Cyclooxygenase-1 (COX-1) is a glycoprotein of 71kDa, which is constitutively expressed in different tissues. COX-1 is encoded by a gene on chromosome 9 and plays a role in tissue homeostasis by modulating several cellular processes ranging from cell proliferation to angiogenesis or platelet aggregation due to thromboxane production [21].

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is the inducible isoform, which is regulated by growth factors and different cytokines such as IL1β, IL6, or TNFα [23], therefore overexpressed during inflammation. The COX-2 gene is located on chromosome 1 and its promoter displays an NFκB response element as well as other cytokine-dependent (i.e., IL6) response elements [21]. The protein shows a 60% homology with COX-1 [24]; in addition, COX-2 presents a C-terminal extension and a different binding site for NSAIDs, which makes COX-2 a preferential target compared to COX-1, thus being specifically inhibited at lower doses [25].

Finally, COX-3 has been identified as a splice variant of COX-1, and it is present mainly in brain and spinal cord [26, 27]. Currently, the role of COX-3 is not known. Some pieces of evidence suggest a possible role in pain sensitivity, based on studies focused on the mechanism of action of acetaminophen (paracetamol), recently evoked as a selective inhibitor of COX-3 [28]. However, this hypothesis is debated because other findings argue that acetaminophen targets at the same time COX-2 [29].

3. COX-2 As a Tumor Promoter and a Good Candidate for Cancer Therapy

Overexpression of COX-2 has been detected in a number of tumors, such as colorectal breast as well as pancreatic and lung cancers [2, 30–32], where it correlates with a poor prognosis. Moreover, overexpression of COX-2 has been reported in hematological cancer models such as RAJI (Burkitt's lymphoma) and U937 (acute promonocytic leukemia) [33, 34] as well as in patient's blast cells [32, 34]. Data suggested that COX-2 may play a role in different steps of cancer progression, by increasing proliferation of mutated cells [30], thus favoring tumor promotion as well as by

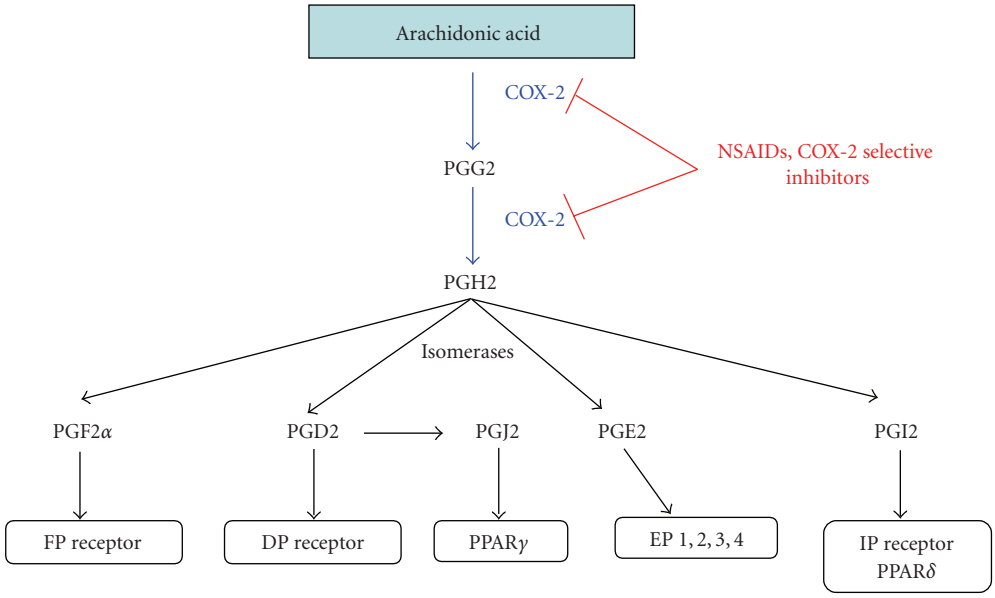


Figure 1: *Metabolism of arachidonic acid by COX-2 and receptors implicated in response to prostaglandins* (according to Chandrasekharan et al. [21]). Prostaglandins act through different receptors to mediate their effects. PGE2 is able to bind four receptors (EP1, 2, 3, and 4). These receptors do not possess the same ligand affinity and their expression is tissuedependent. The different receptors are associated with different intracellular pathways. Most of these receptors are localized in the plasma membrane but nuclear receptors PPARγ can also bind PGJ2. Abbreviation: COX-2, cyclooxygenase-2; PG, prostaglandin; FP, prostaglandin F receptor; DP, prostaglandin D receptor; EP, prostaglandin E receptor; IP, prostaglandin I receptor; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

affecting programmed cell death and affecting the efficacy of anticancer therapies [35–39] to be, finally, implicated in metastasis formation, for example, by affecting apoptosis induced by loss of cell anchorage (anoikis) [40].

COX-2 induction or overexpression is associated with an increased production of PGE2, one of the major products of COX-2 which is known to modulate cell proliferation, cell death, and tumor invasion in many types of cancer including colon, breast, and lung. Prostaglandin E2 acts through different membrane receptors called EP receptors (EP1, EP2, EP3, and EP4) [41]. These receptors are all located on the cell surface and characterized by seven-transmembrane domains, and rhodopsin-type G protein-coupled receptors, but trigger different signaling pathways. Thus, it is known that EP1 signaling acts through phospholipase C/inositol triphosphate signaling, leading to intracellular mobilization of calcium. EP2 and EP4 receptors are coupled with G proteins which activate adenylate cyclase, leading to an increase of intracellular cAMP [41]. cAMP is then able to activate kinases such as protein kinase A (PKA) or PI3K for example, and also GSK3 leading to an activation of β-catenin, a pathway regulating cell proliferation [42, 43]. In contrary to EP2 and EP4, EP3 is coupled with Gi protein, leading to an inhibition of adenylate cyclase, and thus a decrease of cAMP inside the cells [41]. The differential expression of these different receptors according to the cell type may explain the diverse and antagonist effects of PGE2 described in literature.

Until now, there are multiple evidences about the role of PGE2 in tumorigenesis in some cancers. These evidences are mostly described for adherent tumors while this link is poorly understood for hematopoietic malignancies such as leukemia or lymphoma. Indeed, several papers have reported that PGE2 is the most important prostaglandin produced during colorectal carcinogenesis [44]. Moreover, it is known that the level of PGE2 increases in a size-dependent manner in Familial Adenomatous Polyposis (FAP) patients [45], suggesting a correlation between tumor growth and prostaglandin biosynthesis. Tumorigenesis is characterized by a disequilibrium between cell proliferation and cell death. PGE2 is able to inhibit apoptosis in human colon cancer cells. It has been demonstrated that PGE2 can upregulate the level of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in HCA-7 cells (adenocarcinoma), which produce significant amounts of PGE2. This paper described a modulation of the MAPK pathway that precedes the upregulation of Bcl-2 [46]. PGE2 can mediate its effect through EGF receptor, leading to MAPK activation. The ability of PGE2 to modulate tumor progression in colorectal cell has been shown in other models of colon cancer such as HT-29 cells that express EP receptors. In this cell type, PGE2 is associated with an increase of cAMP through EP4 receptor. The effect can be reversed by L-161982, an antagonist of EP4 [47]. Moreover, PGE2 transactivates EGFR by triggering the release of amphiregulin, a well-known EGFR ligand [48]. SC-236, an inhibitor of COX-2, is able to inhibit cell proliferation of HT-29 cells and this effect is greater in combination with an amphiregulin neutralizing antibody [47]. In this cell line, the expression of amphiregulin is correlated to the expression of COX-2.

The transactivation of EGFR by PGE2 can lead also to AKT activation, which is a well-known survival pathway [49]. This effect was well described in a study by Tessner et al. [50] demonstrating that 16,16-dimethyl PGE2 (dmPGE2) inhibits radiation-induced apoptosis in the mouse intestinal epithelium. Using HCT-116 cell line as a model to reflect the effect on mouse small intestine, it has been shown that the anti-apoptotic effect of dmPGE2, which is known to bind EP2, was tightly related to AKT phosphorylation through activation of EGFR and leads to an inhibition of Bax translocation in mitochondria, an important step for apoptosis [51].

PGE2 modulates also tumor growth of lung cancer. This effect has been described by Yamaki et al. [52] showing that PGE2 activates Src kinase in A549 cells, leading to an induction of cell growth. These cells express EP3 that activates Src (sarcoma) kinase. This study has demonstrated that the activation of Src leads to an activating phosphorylation of STAT3, a transcription factor known to regulate cyclin D1 transcription, an important positive regulator of cell proliferation. Apoptosis can be inhibited because STAT3 regulates the transcription of Bcl-XL, a well-known anti-apoptotic protein [53]. Moreover, Src phosphorylates p27, a protein known to inhibit cell cycle progression especially at the G1/S transition [54]. However, it has been recently shown that this protein plays a dual role as the unphosphorylated form of p27 inhibits the cell cycle, and thus cell proliferation. If phosphorylation occurs on T157 and T198 by PI3K (phosphoinositide 3-kinase), it triggers cell cycle transition by stabilizing the cyclin D1/cdk4 complex [55]. Thus phosphorylation of S10 appears to be important for other phosphorylation steps and it has been hypothesized that Src kinase can play this role [55]. Moreover, it is known that phosphorylation of p27 is responsible also for its degradation by the proteasome [56]. All together these data suggest that PGE2 increases cell proliferation via p27 phosphorylation through EP4 receptors.

Nonsmall lung cancer is characterized by a Ras mutation correlated with a poor prognosis [57]. Activation of Ras leads to an upregulation of COX-2 resulting in increased PGE2 production [58]. PGE2 increases cell proliferation of A549 cells (adenocarcinoma) and this effect is associated with an activation of Ras pathway via EP4 receptor. In this case, PGE2 mediates its effect by the release of amphiregulin, the most abundant ligand in A549 cells [59]. EGFR activation leads to activation of MAPK pathway that regulates cell proliferation by transactivating several oncogenes such as c-myc [60].

PGE2 is also important for tumor invasion. A study by Ma et al. [61] described that PGE2 can increase the number of metastasis. This effect has been demonstrated in a model in which murine mammary tumor cells 66.1 were injected in syngenic immune competent BALB/CByJ mice. All these cell lines express EP1, 2, 3, and 4. The use of EP4 antagonists (AH23848 and AH6809) decreased surface tumor colonies and reduced tumor invasion. Another study has revealed that PGE2 increases the level of VEGF in granuloma [62]. VEGF is an important factor of angiogenesis, and thus of tumor progression by enhancing the vascularization of the tumors [63].

Alltogether these data together suggest that PGE2 and, thus, COX-2 play an important role in tumor progression by enhancing cell proliferation, cell survival, and tumor invasion. The diversity of PGE2 receptors and their different signaling pathways suggest that the protumorigenic effect of PGE2 depends on the cell type and the type of receptor expressed. Until now, many signaling pathways associated with tumor progression are linked to PGE2 and this could explain why the use of COX-2 inhibitors is a good strategy in cancer therapy. However, the signaling pathways of EP receptors are not completely characterized and their precise roles in the different cancers remain to be elucidated before a clinical application.

COXs may be targets of several compounds that may inhibit their functions. Combination of such preferential or selective COX-2 inhibitors with anti-cancer agents already used in clinics were tested with the goal to improve the efficiency of anti-cancer protocols.

COX-2 is the preferential target of several NSAIDs (Figure 2) [64, 65]. Historically, NSAIDs used for clinical and anti-inflammatory purposes were represented by the nonselective COX-2 inhibitors, to which belong aspirin, sulindac acid and, more recently, agents such as nimesulide, ibuprofen and naproxen. As their definition well reflects, this first generation of NSAIDs may affect both main COXs isoforms, even if preferentially COX-2 (see above). Their mechanisms of action are not all completely elucidated, complicated by the fact that different agents seem to act in different ways. For example, different NSAIDs bind the active site of COX-2. Commonly, binding occurs by a reversible competitive inhibition (i.e., ibuprofen, naproxen, and indomethacin). In contrast, aspirin is able to acetylate the active site of COX at a serine residue, leading to an irreversible inhibition (see Figure 2, summarizing the classification of COX-2 inhibitors mentioned in this review). Considerable side effects generated by the interference with homeostatic functions modulated by COX-1 include increased incidence of gastrointestinal hemorrhage and ulceration upon chronic or long-time intake [66]. A novel generation of COX-2-selective inhibitors NSAIDs termed "Coxibs" was then developed. These compounds promised to be much less gastrotoxic. They act as competitive inhibitors of the active site of COX-2 and present indeed a higher specificity. However, concerns related to a long-time/chronic intake of these drugs raised quite soon, following some clinical reports, suggest a correlation between an increased risk of myocardial infarction and their consumption [67]. This has lead to the voluntary withdrawal of some of these agents, that is, rofecoxib and valdecoxib [68], and drastic regulatory advices regarding the use of the other ones, thus opening a discussion on the real benefits versus side effects of their use in clinics. Consequently, studies focused on the use of traditional versus COX-2-selective NSAIDs, frequently associated to the elaboration of economical models, have been performed in these latest years, with the aim to evaluate the real risks together with the costeffectiveness and, possibly, identify classes of users/patients where regular NSAIDs intake may be beneficial. Although, further analyses need to be performed, a number of reports suggest that Coxibs may really increase

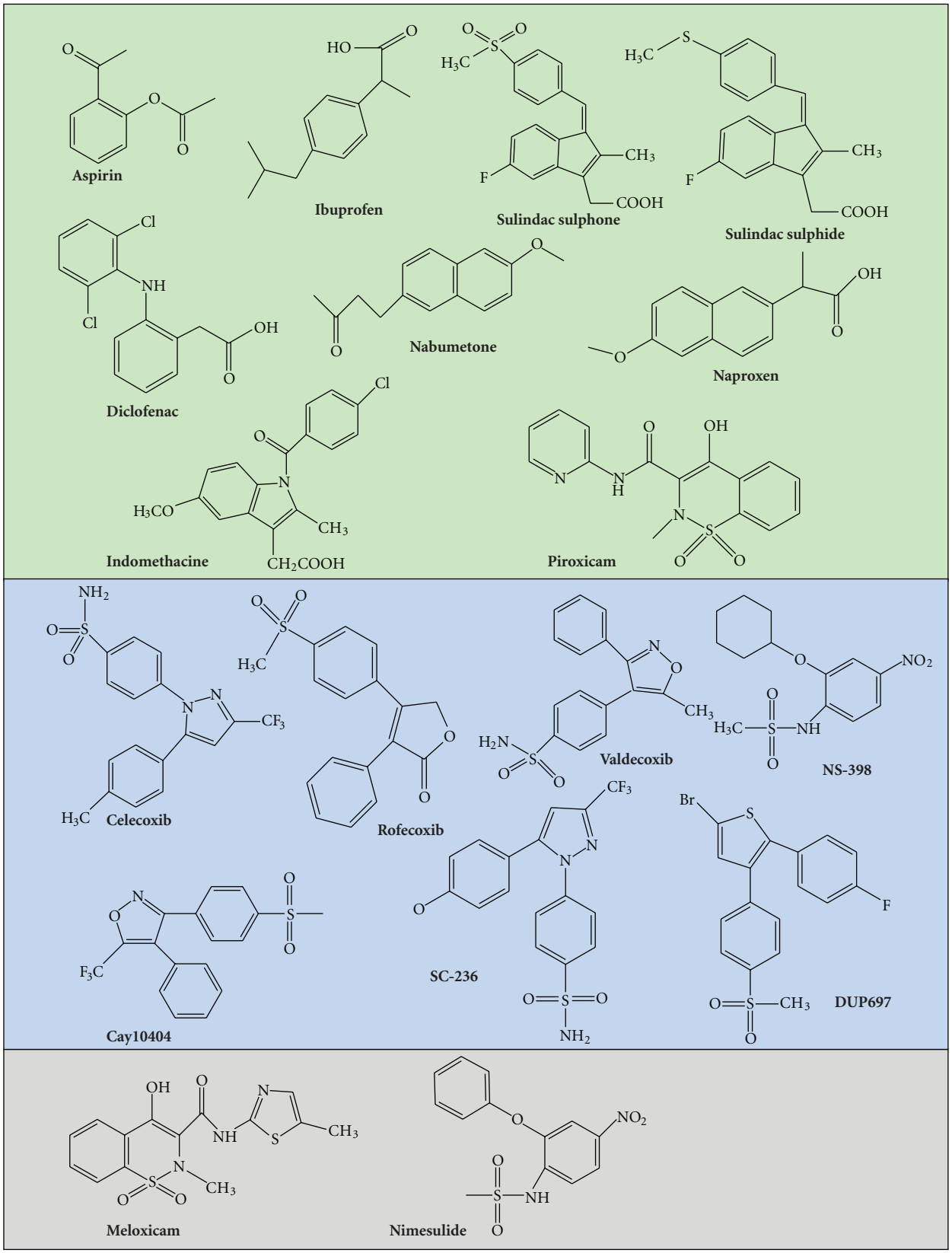


Figure 2: *COX-2 inhibitor classification.* COX-2 is the target of many compounds. COX-2 inhibitors described in this review are classified according to their ability to inhibit COX-2: nonselective (green), selective (pale blue), and preferential (grey).

cardiovascular risks only in patients presenting a positivity to other cardiovascular factor risks, as high blood pressure and altered lipid metabolism [69–73]. These results suggest that their use should be limited to patients with a low risk of cardiovascular complications after analysis of multiple biomarkers [Chaiamnuay et al., 2006, clinical reviews]. Therefore, the future perspective in the pharmacological use of preferential versus selective COX-2 inhibitors is the identification of a panel of interesting biomarkers, helping in defining individual biological risk factors and limiting the use of a specific class of COX-2 inhibitors to the appropriate responders [74, 75]. This approach will have a considerable implication in therapy as well as in chemoprevention of inherited forms of colon cancer.

It is interesting to mention that recent alternative approaches have been considered. Strillacci et al. [76] and Chan et al. suggested RNA interference using adenoviral vehicles. Moreover, other selective COX-2 inhibitors have been developed and experimentally used: SC-558 [35] , DUP-697 [77], SC-58125 [78], and NS-398 [8]. Some of them induce an irreversible inhibition. This is the case for NS-398, which acts by inducing a conformational change of COX-2 [25] (Figure 2). Another strategy discussed in literature could be the use of EP receptor antagonists. Indeed, it has been demonstrated that EP antagonists can decrease cell proliferation and cell invasion [47, 61, 79]. This could be a more specific strategy that could limit the other side effects of classic COX-2 inhibitors.

4. COX-2 As a Regulator of Cell Proliferation

Cell cycle is regulated by different serine-threonine kinase proteins called cyclin-dependent kinase (Cdk). These proteins regulate the different steps of cell cycle progression by phosphorylating many substrates (i.e., nuclear lamins) [54]. These proteins are regulated by phosphorylation and dephosphorylation. Thus, Cdks can be activated by phosphatases such as CDC25C (*cell division cycle 25 homolog C*) for CDK1 or kinase like CAK (Cdk activating kinase). The activity of cdks is also regulated by cyclins, which form heterodimers with cdks leading to an activation of Cdks by conformational change [54, 80].

Cell cycle is under the control of other factors, implicated in the regulation of cell cycle transition. These regulatory mechanisms form checkpoints where the cell cycle can be stopped after cellular damage in order to allow repair and to maintain cellular integrity or, alternatively, to eliminate mutated and potentially dangerous cells. The INK4 family (p16, p15, p18, and p19) and the Cip/Kip family (p21, p27, and p57) [54, 80, 81] are key regulators of G1/S transition. For example, after DNA damage, p53, a tumor suppressor gene, activates transcription of p21, which inhibits cyclin E phosphorylation leading to hypophosphorylation of retinoblastoma protein (pRb) [81]. INK4 family inhibits Cdk4 and Cdk6, whereas Cip/Kip family inhibits all Cdks. Retinoblastoma protein needs to be phosphorylated in order to release transcription factor E2F activating genes involved in the S phase-like PCNA (proliferating cell nuclear antigen) [82]. p53 is also important for the regulation of the G2/M transition, which requires activation of the cyclin B-cdk2 complex. This complex accumulates during the previous step of the cell cycle but is inactivated by a phosphorylation at tyrosine 15 and threonine 14 by Wee 1 and Myt 1. These phosphate groups are removed by the phosphatase CDC25A when cells enter mitosis. In the case of DNA damages, p53 is activated and increases the level of p21 that is directly inhibiting cdk2. Moreover, 14-3-3 protein, a transcriptional target of p53, leads to a sequestration of cdk2 in the cytoplasm [83]. Other mechanisms involved in the regulation of the G2 checkpoint or the mitotic spindle checkpoint are reviewed by Stewart et al. [54].

Cancer cells are characterized by deregulation of the cell cycle via alteration of cell cycle controllers (cyclins) and cell cycle regulators (p53) [54], resulting in a perturbation of cell cycle checkpoints.

Currently, there is evidence that prostaglandins produced by COX-2 intervene in tumor cell proliferation as NSAIDs and selective COX-2 inhibitors inhibit proliferation of different cancer cell types expressing COX-2 [30]. NS-398, a COX-2 specific inhibitor, was described to reduce cell proliferation of MC-26 cell line, a highly invasive mouse CRC cell model expressing constitutively COX-2 [8]. This effect was associated with a reduction of cyclin D level, a key protein involved in G1-S transition [54], and PCNA, thus increasing the processivity of DNA polymerase [82]. NS-398 and COX-2 specific inhibitor nabumetone reduced cell proliferation of U937 (acute promonocytic leukemia) and ML1 (human myeloblastic leukemia), thus leading to an accumulation in G0/G1 phase [33]. Interestingly, meloxicam was also able to downregulate PCNA and cyclin A in HepG2 cell line (hepatocellular carcinoma cells), leading to an inhibition of the cell proliferation and an accumulation of the cells in G0/G1 phase of cell cycle [84]. Alternatively, the link between COX-2 and CRC has been demonstrated by the fact that prostaglandin E2 (PGE2) derivating from COX-2-mediated arachidonic acid metabolism increased the proliferation of colorectal cancer cells [85].

The inhibitory effect of NSAIDs on cell proliferation of CRC has been also observed in ovarian cancer. Indeed, treatment of OVCAR-3 tumors xenotransplanted in nu/nu mice (nude mice) with aspirin and piroxicam (NSAIDs) and the selective COX-2 inhibitor meloxicam led to a reduction of tumor growth [86].

It has been estimated that 40% of breast cancers show an overexpression of COX-2, which is associated with a bad prognosis [5]. Indomethacin (NSAIDs), celecoxib, rofecoxib and nimesulide have been shown to able to inhibit cell proliferation of these cells [5]. Moreover, prostaglandins were able to increase cell proliferation of hormonal-dependent breast cancer by increasing transcription of CYP19 aromatase implicated in estrogen biosynthesis [87].

Several studies revealed that inhibition of COX-2 by celecoxib in Burkitt's lymphoma cell lines RAJI, BjAB, (Epstein-Barr virusnegative), and BL41 led to a reduction of cell proliferation [34]. NS-398 and celecoxib were able to reduce proliferation of pancreatic cancer cell line, Panc-1 in a dose-dependent manner [88]. Treatment with celecoxib of these cells implanted into nude mice led to a reduction of

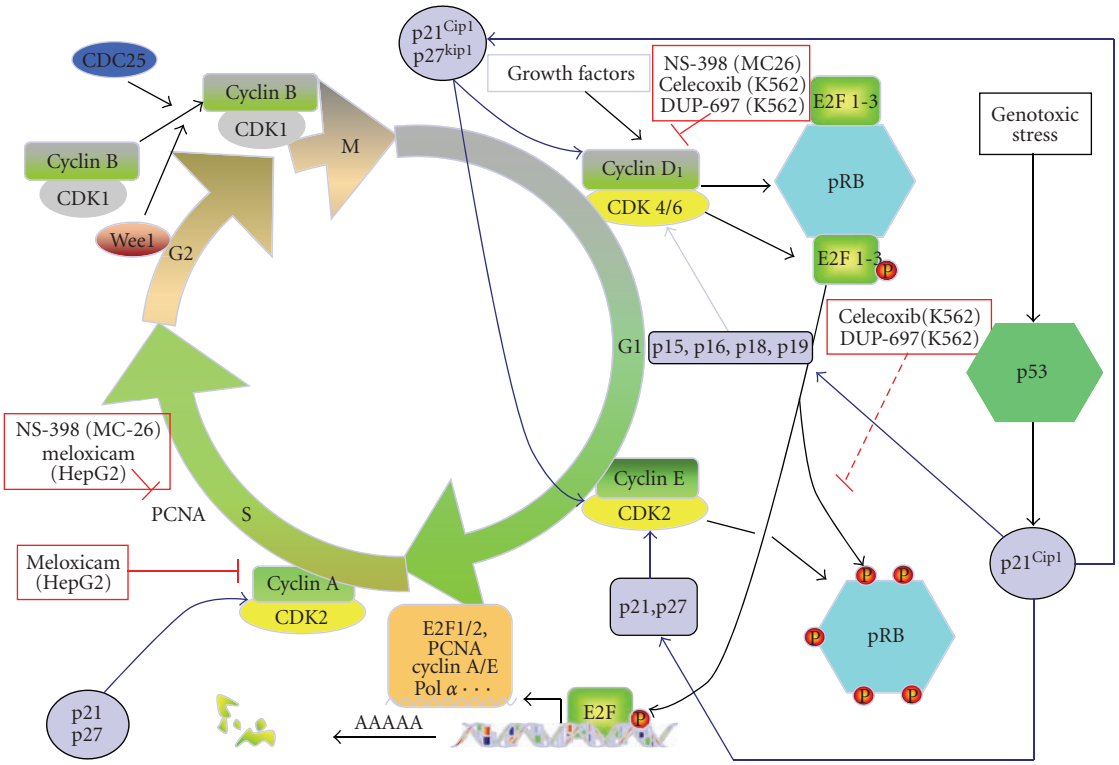


Figure 3: *Effects of COX-2 inhibitors on cell proliferation.* Cell cycle is divided into different steps: G1, S, G2, and M (mitosis). This process is regulated by cyclin proteins, which activate cyclin-dependent kinase (cdk) and phosphatase (i.e., CDC25) or kinase like cyclin-dependent kinase inhibitors such as p16, p15, p18, p19, p21, and p27 [54]. Selective COX-2 inhibitors are able to modulate some cell cycle checkpoints. In this picture, some examples of this link have been shown for different cell types: MC26, colorectal cancer; HepG2, hepatocellular carcinoma; K562, chronic myeloid leukemia. Cdk; cyclin-dependent kinase; pRb, retinoblastoma protein; PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

the volume of the tumor [88]. Other studies have shown that celecoxib is able to reduce cell proliferation of the chronic myeloid leukemia (CML) cell line K562, which expresses COX-2 at the mRNA and protein level [89]. This effect was accompanied by an accumulation of cells in G0/G1. Moreover, the inhibition of cell proliferation was correlated to a downregulation of cyclin D1, cyclin E, and pRb and the upregulation of p16 and p27 [89]. Similar results were found on this cell type with the other selective COX-2 inhibitor DUP-697 [77]. Different effects are recapitulated in Figure 3.

5. Implication of COX-2 in Cell Death

5.1. Apoptosis. Apoptosis (type I cell death) is important for the development and maintenance of tissue homeostasis of multicellular organisms [90, 91]. This active form of cell death is characterized by the occurrence of typical cell alterations including plasma membrane blebbing, cell shrinkage, chromatin condensation and nuclear fragmentation, and, finally, formation of apoptotic bodies, which can be phagocyted by macrophages [92]. Deregulation of apoptosis is linked to several pathophysiological disorders, including autoimmune disorders, Alzheimer's disease, and cancer [93].

Two major cascades of intracellular events are commonly involved in mediating apoptosis (Figure 4). The intrinsic pathway, also called the mitochondrial or stress-induced apoptotic pathway, is activated in response to damaging stresses, such as DNA damage. Typical hallmarks of this pathway are mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), accompanied by a collapse of the mitochondrial membrane potential [51]. These events lead to the release of cytochrome *c* into the cytosol, which is an indispensable component of the apoptosome, the death complex formed also by APAF-1, and procaspase-9. Once recruited, this protease is cleaved to its activated form (caspase-9) to further activate the executor caspase-3 and, finally, to finalize the apoptotic program.

Alternatively, the extrinsic, or physiological, apoptotic pathway (Figure 4) can be triggered upon binding of specific ligands to death receptors characterized by the presence of a death effector domain [94]. Ligands include cytokines, such as TNFα, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis (TRAIL), or FAS. After binding, death inducing silencing complex (DISC) is formed. The DISC is composed by the adaptors proteins TRADD (TNF receptor-associated death domain) and FADD (Fas-associated death domain) and is able to recruit and activate pro-caspase-8. Finally, caspase-8 activates caspase-3 in order to trigger the final steps of apoptosis (Figure 4).

Cross-talks between the two pathways take place. The extrinsic apoptotic pathway can activate the intrinsic

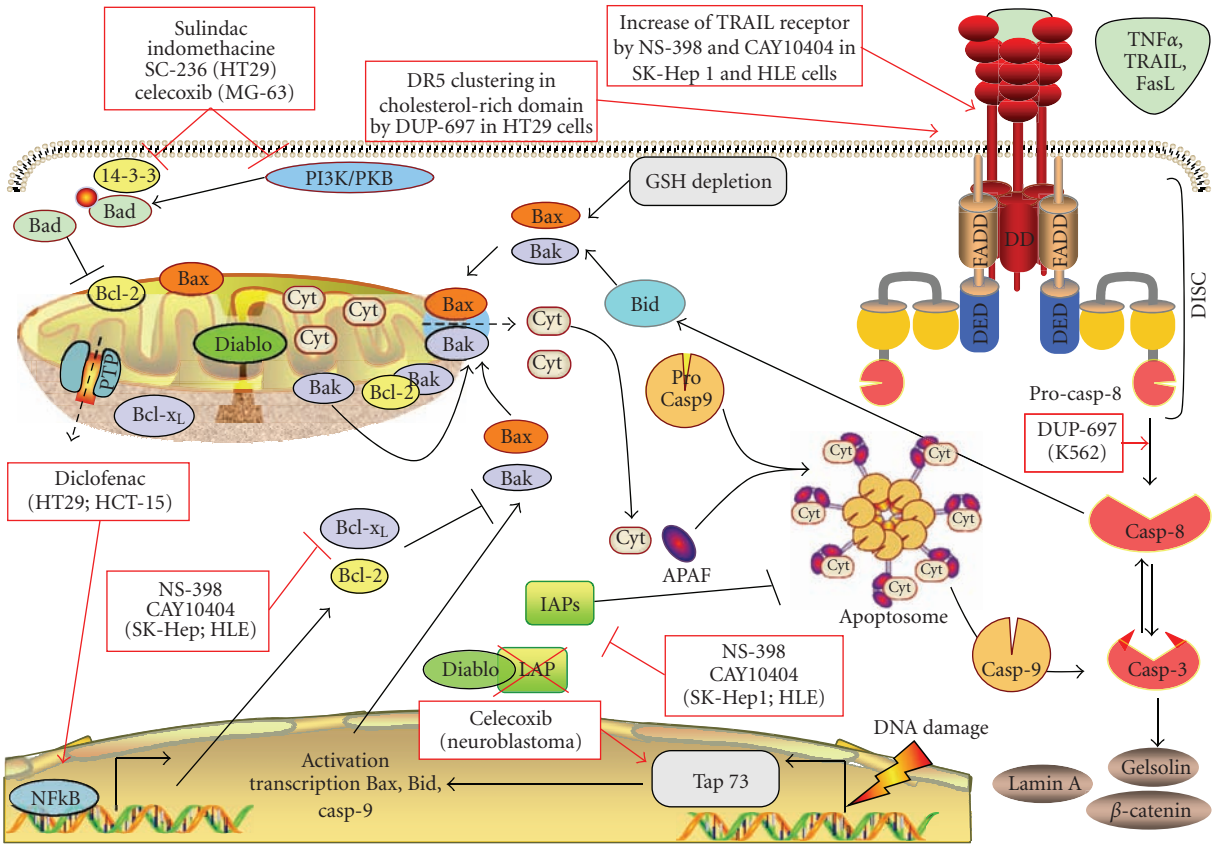


FIGURE 4: *Effects of COX-2 inhibitors on apoptosis.* Apoptosis can be mainly mediated by two pathways: the mitochondrial, intrinsic, or stress-induced apoptosis, which is activated in response to damaging stresses and the extrinsic pathway, triggered by the binding of ligands to specific death receptors [51]. COX-2 inhibitors are able to modulate stress-induced apoptosis as well as extrinsic apoptosis in several cell types. In this picture, some examples of these interaction discussed in the text are presented for different cell types: LNCaP, prostate cancer; K562, chronic myeloid leukemia; HT29, colorectal cancer; SK-Hep 1 and HLE, human hepatocarcinoma cells; HepG2, hepatocarcinoma; Be17402, hepatocarcinoma; SMMC-7402, hepatocarcinoma; MG-63, osteosarcoma. Abbreviation: AIF: apoptosis-inducing factor; Bcl-2, B cell lymphoma 2; Bid, Bcl-2 interacting domain; Casp, caspase; Cyt, cytochrome C; DD, death domain; DED, death effector domain; DISC, death-inducing silencing complex; PI3K/PKB, phosphatidyl inositol-3 kinase/protein kinase B; FADD, Fas-associated death domain; GSH, glutathione; PTP, transition permeability pore; TNF, tumor necrosis factor; TRAIL, TNF-related-inducing-apoptosis-ligand.

pathway via truncation of the BH3-only protein Bid (t-Bid) by caspase-8. t-Bid interacts with mitochondria, by favoring the activation of the proapoptotic Bcl-2 family members Bak and Bax, thus leading to MOMP and caspase-9 activation [51, 95] (Figure 4). The intrinsic apoptotic pathway may, in turn, activate caspase-8, downstream to caspase-3 [96] (Figure 4). Cross-talks represent an important strategy of amplification loops carried out by dying cells to ensure/potentiate cell death.

5.1.1. Involvement of COX-2 in Intrinsic Apoptosis. When cells are damaged by a variety of chemicals or physical stress (i.e., reactive oxygen species, UV, and ionizing radiation), they undergo apoptosis by triggering the intrinsic apoptotic pathway (Figure 4). This pathway may be associated with a redox disequilibrium, mediated by depletion of glutathione (GSH) [94, 97, 98], required for the activation and translocation to mitochondria of the Bcl-2 pro-apoptotic member Bax [98], which, in turn, forms complexes (oligomers) mediating MOMP and cytochrome *c* release. As Bax, Bak may play the same role [99]. In contrast to Bax, Bak is already present at the surface of mitochondria, normally sequestered in its active monomeric form by the Bcl-2 anti-apoptotic members Bcl-xL and Mcl-1 (see Burlacu for a general overview of the Bcl-2 family members modulation involved in Bax/Bak activation [51]).

Apoptosis is regulated in order to maintain tissue homeostasis. This regulation implicates protein-protein interactions, with some of them counteracting apoptosis. In this view, the interaction between Bcl-2 family pro- and antiapoptotic members represents a crucial and delicate step. Bcl-2 is the best described member of this family preventing Bax activation [51]. Bax can form also a complex with the anti-apoptotic protein Bcl-xL [53] and Mcl-1 [14]. Similarly, Bak activity is monitored by the anti-apoptotic members Bcl-xL and Mcl-1 [51]. The interaction between Bax/Bak and the Bcl-2 family anti-apoptotic members is carefully regulated by the BH-3-only proteins. Another carefully regulated downstream checkpoint of the apoptotic pathway is the activation of caspases. Inhibitor of apoptosis (IAP) family, by directly

interacting with caspases (i.e., XIAP, survivin [100]) controls and prevents their activity once cleaved. IAPs monitoring function can be, in turn, counteracted by the pro-apoptotic SMAC/DIABLO, a mitochondrial heterodimer, which is released from mitochondria when MOMP is affected [101]. This interaction favors the induction of apoptosis.

Imbalance between cell proliferation and apoptosis observed in cancer can be tightly related to an altered function of pro-apoptotic proteins as well as to an up-regulation of anti-apoptotic proteins (i.e., Bcl-2 or IAPs) or a downregulation of tumor suppressor genes (i.e., p53). In addition, the activation of prosurvival pathways (i.e., PI3K/Akt) may be implicated upstream. Inflammation can contribute to this imbalance *via* cytokines secreted in the tumor microenvironment able to activate survival pathways. For example, TNFα can induce NFκB, leading to an inhibition of apoptosis [38]. COX-2 seems also to play a role in this process because it is known that COX-2 inhibition is correlated to an increase of apoptosis in several cancer models. NS-398 downregulated Bcl-2 expression in an androgen-sensitive human prostate cancer cell line LNCaP that exhibited a high constitutive level of COX-2 [102]. Similar results have been observed in human colorectal cancer cells (HCA-7 cell line which expresses COX-2) where PGE2 was able to inhibit apoptosis induced by SC58125, a selective COX-2 inhibitor, and increase Bcl-2 expression [46]. Different mechanisms are supposed to explain how COX-2 inhibitors may trigger apoptosis. In a number of studies, COX-2 inhibition was linked to a concomitant increase of intracellular arachidonic acid. In HT-29 human colon adenocarcinoma cell this accumulation led to the induction of apoptosis [103]. The arachidonic acid-induced apoptosis was inhibited by Bcl-2 transfection, indicating a role of arachidonic acid in affecting Bcl-2 intracellular levels [103]. Accumulation of arachidonic acid can affect apoptosis by mediating an increase of pro-apoptotic intracellular ceramides caused by activation of sphingomyelinase [104, 105]. Sulindac sulphide, a metabolite of sulindac, also activates sphingomyelinase and enhances the ceramide level in the two human colorectal carcinoma cell lines HCT116 and SW480 [106].

COX-2 reduces pro-apoptotic nitric oxide (NO) levels in cancer cells downstream of prostaglandin production [30] (see Brüne et al. [107] for an overview on nitric oxide role in apoptosis). Chang et al. reported that PGE2 prevented apoptosis induced by NGF (nerve growth factor) withdrawal by increasing the level of dynein light chain, an inhibitor of neuronal NO synthase in pheochromocytoma of the rat adrenal medulla PC12 cells, thus leading to decreased intracellular NO levels [108].

More recently, connections between COX-2 inhibitors and p53 family members have been described. For example, celecoxib was shown to able to modulate different isoforms of p73, a p53 family member in neuroblastoma cell lines [109]. p73 encodes many isoforms with different roles. Tap73 is pro-apoptotic and contains a transactivation domain. This isoform is considered as a tumor suppressor gene because it seems to be involved in cell cycle regulation as well as in apoptosis induction [109, 110]. In contrast, DeltaNp73 is anti-apoptotic and lacks the transactivation domain. DeltaNp73 is overexpressed in neuroblastoma, leading to chemotherapy resistance [109]. It has been shown that celecoxib was able to upregulate Tap73 and downregulate DeltaNp73. These data suggest the use of COX-2 inhibitors as p73 modulators in order to improve efficiency of chemotherapy [110].

The apoptotic effect of COX-2 inhibitors has been also observed for other tumor cell types, such as in the chronic myeloid leukemia model K562 where DUP-697 induced apoptosis by cell cycle arrest and caspase-8 activation [77].

COX-2 inhibitors can also activate prosurvival pathways. The PI3K/Akt pathway is a survival pathway, frequently activated in cancer cells [49]. PI3K produces PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate) that activates PDK1 (pyruvate deshydrogenase kinase). This protein phosphorylates and activates PKB (protein kinase B), which, in turn, is responsible for the phosphorylation of several targets playing a modulator function in apoptosis. An anti-cancer effect of celecoxib due to the inhibition of Akt signaling [111] was observed in a gastric cancer model. Celecoxib triggered also apoptosis in osteosarcoma cells (MG-63) through down-regulation of Bcl-2, survivin and PI3K (phosphoinositide 3-kinase) pathway [112]. Similarly, Hsu et al. [113] found that inhibition of Akt phosphorylation by celecoxib in prostate cancer models (LNCaP and PC3 cell lines which express constitutively COX-2) led to apoptosis, but in this case without affecting Bcl-2 level.

The PI3K pathway is negatively regulated by PTEN (phosphatase and TENsin homolog), which converts PIP3 in PIP2, preventing PKB activation and Bad phosphorylation/sequestration. Thus PTEN is considered as a tumor suppressor gene. It has been shown that NS-398 was able to increase the level of PTEN in human gastric carcinoma cell line MKN45 [114].

One of the PKB targets is Bad, a BH3-only member [51]. The nonphosphorylated form of Bad plays a pro-apoptotic role, by binding Bcl-xL or Bcl-2 and, thus, preventing their interactions with Bak and Bax. The activation of PI3K/Akt pathway may lead to the phosphorylation of Bad, which is consequently sequestrated in the cytoplasm by 14-3-3 protein and, in this way, inhibited in its pro-apoptotic function [51]. It has been reported that sulindac sulphone, indomethacine, and SC-236 were able to induce apoptosis *via* Bad activation, by inhibiting 14-3-3 expression in a dose- and time-dependent manner in HT-29 cells [115]. This effect was tightly related to PPARδ. It is known, indeed, that 14-3-3 protein contains PPRE recognized and bound by PPARδ [115]. COX-2 can mediate the synthesis of prostaglandin I2, which can bind and activate PPARδ [41]. Thus, it has been suggested that the inhibition of COX-2, leading to a decrease of PGI2, impaired PPARδ activation, which, in turn, was responsible for a downregulation of 14-3-3 protein, thus allowing Bad to play its pro-apoptotic functions [115].

NFκB is a most important transcription factor involved in survival by enhancing transcription of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2 [14, 15]. Sulindac inhibits NFκB in two colon cancer cell lines (human colon adenocarcinoma

HCT-15 and HT29 cell lines) [116]. Similar results were obtained with diclofenac, which was able to inhibit nuclear accumulation of NFκB [117]. In the same study, PGE2 was demonstrated to increase the transcriptional activity of NFκB p65/p50 dimer in CACO-2 cells (human epithelial colorectal adenocarcinoma cells), transfected with a luciferase construct containing NFκB response elements [117].

It is known that activation of prostaglandin receptors induces an increased cAMP level which in turn can activate protein kinase A (PKA) [58]. Studies have suggested that PKA, like PKB, phosphorylates Bad [118], leading to its sequestration and inhibition of apoptosis. Some of the pro- or anti-apoptotic mediators affected by COX-2 inhibitors are schematized in Figure 4.

5.1.2. Implication of COX-2 in Extrinsic Apoptotic Cell Signaling Mechanisms. Studies reported that COX-2 inhibitors are also associated with a sensitization of tumor cells to extrinsic apoptosis. Thus, DUP-697 sensitized HT29 colon cancer cell line to TRAIL-induced apoptosis. This effect was due to an accumulation of arachidonic acid inside the cells, which activates sphingomyelinase, triggering a clustering of death receptor (DR) 5 receptors in ceramide and cholesterol-rich domains [119]. Alternatively, the expression of COX-2 has been frequently associated with a modulation of the expression of death receptors, thus leading to an upstream control of the extrinsic apoptotic pathway. Tang et al. [120] showed that COX-2 overexpression in human colon cancers cells led to an inhibition of DR5 expression and a resistance to TRAIL-induced apoptosis. Accordingly, COX-2 specific inhibitors, NS-398 and CAY10404, are sensitizing human hepatocarcinoma cells (SK-Hep1 and HLE) to TRAIL-induced apoptosis. This effect was due to an upregulation of TRAIL receptors (TRAIL R2/DR5 and TRAIL-R1/DR4), together with an ability of the compounds to induce a down-regulation of the anti-apoptotic proteins survivin (IAP) and Bcl-xL [121]. In hepatocellular carcinoma models (HepG2, Bel7402, and SMMC-7402), Li et al. [84] showed that COX-2 inhibition with meloxicam led to an upregulation of Fas-mediated apoptosis. In vivo studies performed on transgenic mice constitutively expressing human COX-2 confirmed an increased resistance to Fas-induced apoptosis in liver, as shown by the preservation of liver architecture in COX-2-expressing mice compared to wild type [122]. Similarly, another study performed on human extrahepatic bile duct carcinoma cell line showed that COX-2 induction led to the inhibition of Fas-induced apoptosis, whereas the inhibition of COX-2 with NS-398 in cytokine-treated cells exacerbated apoptosis induced by CH-11, an agonist of Fas receptor [123].

AKT pro-survival pathway may play a role also in the modulation of extrinsic apoptosis. The human gastric carcinoma cell line MKN45, which expresses COX-2, was sensitized to Fas-induced apoptosis by NS-398. The COX-2 inhibitor, indeed, was able to increase the level of PTEN, leading to a decrease of Akt phosphorylation and activation of Bad [114]. Some effects of COX-2 inhibitors on extrinsic apoptosis are summarized in Figure 4.

Altogether, these results encourage the perspective that COX-2 inhibitors could be used in future as a therapeutic strategy to sensitize tumor cells to apoptosis induced by physiological stimuli.

5.2. Involvement of COX-2 in Other Types of Cell Death

5.2.1. Anoikis. Anoikis is a form of apoptosis mediated by the loss of cell anchorage. This pathway plays a fundamental role during development and maintenance of tissue homeostasis by killing damaged cells or detached cells in order to maintain tissue architecture. For example, the inner endodermal cells undergo anoikis after the loss of anchorage to the matrix during development [124]. It is known also that intestinal epithelial cells loose anchorage when located at the luminal surface, leading to anoikis [42]. As a form of apoptosis, anoikis is dependent on caspase activation and cytochrome *c* release by mitochondria and is regulated by Bcl-2 family members [42].

It has been shown that anoikis is prevented in cancer cells, thus favoring tumor progression with the formation of metastasis [42]. Accordingly, modulation of anoikis is considered a promising target for anti-cancer strategies.

Cell anchorage is due to cell-cell and cell-matrix interactions. Cell-cell interactions are mainly mediated by integrins which are transmembrane receptors located at the cell surface and composed of alpha and beta chains [125]. Many intracellular signals can act downstream to integrins, which, correctly switched on, can ensure cell survival. Some of them are mediated by kinases such as Focal-adhesion-kinase (Fak) or integrin-linked kinase (ILK) [42]. Fak is phosphorylated upon integrin adhesion, leading to activation of other signaling pathways like PI3K, MAPK. ILK is a serine/threonine kinase that directly phosphorylates PKB.

Together with cell-cell and cell-matrix interactions, paracrine factors could be important for the regulation of anoikis. It has been shown that E-cadherin (epithelial cadherin) can activate COX-2 [23]. It is possible that prostaglandins produced by COX-2, which act in an autocrine and a paracrine manner, favor cell survival. A study from Joseph et al. [126] showed that PGE2 inhibited anoikis in IEC-18 cells (rat intestine ileum cells). This effect was suggested to be due to cAMP signaling because prostaglandin E2 receptors are coupled to adenylate cyclase, which converts AMP to cAMP [126].

Other studies demonstrated that COX-2 inhibits anoikis via activation of PI3K/Akt pathway, as the case of a human bladder cancer cell line expressing COX-2 [40]. A link between COX-2 and anoikis has been described, furthermore, in uterine endometrial carcinoma [127]. COX-2 is over-expressed in this type of cancer and this is associated with tumor aggressiveness. In addition, a recent report based on HEC-1B and RL95-2 (two human endometrial cancer cell lines) showed that the treatment of these cells with hepatocyte growth factor (HGF) led to an up-regulation of COX-2. Hepatocyte growth factor interacts with its tyrosine kinase receptor c-Met. This interaction is responsible for tumor progression. Overexpression of HGF/c-Met has been described in different tumors such as breast cancer [128]

as well as head and neck cancer [129], also in endometrial carcinoma [130]. It has been demonstrated that HGF inhibited anoikis and treatment of HEC-1B and RL95-2 cells with the COX-2 selective inhibitor meloxicam prevented HGF-mediated anoikis resistance [127]. Similar results were obtained in head and neck squamous cell carcinoma [131].

Altogether these data suggest that COX-2 may be implicated in the inhibition of anoikis and that COX-2 inhibitors may play a role in inhibiting tumor progression (metastasis), by sensitizing tumor cell to anoikis.

5.2.2. Autophagy. Autophagy is a process triggering cells to degrade intracellular constituents, ranging from proteins up to entire organelles. It represents an important process ensuring the turnover of long-lived cellular components, which can be activated also by stress conditions like nutrient starvation in order to avoid cell death. The process starts with the formation of doubled membrane-bound vacuoles corresponding to autophagosomes that entrap parts of the cytoplasm or organelles (i.e., mitochondria). Then, these structures are fused with lysosomes (autolysosomes), thus leading to the degradation of the intracellular parts previously enclosed. Together with apoptosis, when exacerbated, autophagy contributes to the modulation of homeostasis, by eliminating damaged and potentially dangerous cells (type II cell death) [132]. However, the relationship between apoptosis and autophagy is currently still poorly understood [132] because in some cases autophagy permits an adaptation of the cells to stress (i.e., nutrient starvation), thus counteracting apoptosis, whereas, in other cases, autophagy is a process triggering downstream apoptosis [132]. Indeed, similar stimuli can induce both apoptosis or autophagy [132].

This process is implicated in pathologies such as Alzheimer's disease and cancer, suggesting a promising field in therapy. By considering that COX-2 is supposed to play a role in apoptosis and a link between apoptosis and autophagy exists, it is conceivable that COX-2 plays a role also in this process. Currently, not many studies aimed at investigating a possible link between COX-2 and autophagy have been published. Nevertheless, one study revealed that sulindac sulphide (NSAIDs) induced apoptosis of the colon cancer HT29 cell line. This effect was increased by treatment of the cells with 3 methyl-adenine, a well-known inhibitor of autophagy [133]. Moreover, the extent of apoptosis in Q204L cells (a clone of HT-29 cells in which 3 methyl-adenine-sensitive autophagic sequestration is impaired) was less than in HT29. These data suggest that autophagy can delay sulindac sulphide-induced apoptosis [133].

6. COX-2 Inhibitors in Cancer Therapy

Despite the latest progress in cancer research and the different strategies to kill cancer cells, several tumors are resistant to conventional therapeutics treatment (i.e., radiotherapy, chemotherapy, and photodynamic therapy).

COX-2 inhibitors play an important role in cancer prevention. Indeed, the chronic intake of NSAIDs is able to consistently reduce the appearance and incidence of many types of cancer as described in Familial Adenomatous Polyposis (for celecoxib) [134, 135] and also in breast cancer [136]. This property of COX-2 inhibitors could be useful for patients with a high risk to develop cancer such as people with Li-Fraumeni syndrome, for example [137]. The fact that many reports in literature suggest that COX-2 inhibitors are responsible for an inhibition of cell proliferation and apoptosis induction in a number of different cancer cell models prompts to consider a possible use of COX-2 inhibitors in future therapeutical protocols, administered alone as well as in combination with anti-cancer clinical protocols in order to improve tumor cell death.

6.1. COX-2 Inhibitors in Combination with Radiotherapy. Radiation therapy is a common treatment used for the treatment of solid tumors, such as breast, prostate, colorectal, and lung cancers. It is known that the anti-cancer properties of ionizing radiation are due to pleiotropic mechanisms. Radiation leads to the formation of DNA doubled-strand breaks in proliferating cells, which triggers the activation of DNA damage pathways (i.e., p53), followed by the induction of apoptosis [36]. The importance of Bcl-2 family members during apoptosis [51] suggests that prosurvival proteins (i.e., Bcl-2, Bcl-xL) play an important role in radioprotection of tumor cells. The NFκB pathway seems to be implicated, being required in regulating expression of the anti-apoptotic Bcl-2 family members like Bcl-xL [36]. Moreover, it is well established that NFκB regulates the level of COX-2, suggesting that COX-2 may play a role in radiotherapy resistance [21]. Similarly, nimesulide could increase radiation efficiency in nonsmall cell lung cancer in vivo (nude mice) and in vitro (A549 cell line) as shown by Grimes et al. [138]. This effect was due to a down-regulation of MnSOD (superoxide dismutase containing manganese (Mn) and localized in mitochondria), a primary antioxidant protein and survivin, an anti-apoptotic protein (IAPS family member). These two proteins are regulated by NFκB. It is well known that during radiation therapy NFκB can be upregulated due to reactive oxygen species release and inflammation (i.e., PGE2). This report suggests that nimesulide may act on NFκB to inhibit MnSOD and survivin.

Melanoma is known to be very resistant to conventional radiotherapy and chemotherapy. Irradiation of two melanoma cell lines WM35 and LU1205 in the presence of NS-398, a selective COX-2 inhibitor, strongly exacerbated the G2/M arrest as well as the induction in apoptosis. Accordingly, the down-regulation of COX-2 by RNA interference in these cell lines was followed by an upregulation of p53 and G2/M arrest [36], thus confirming that the effect of NS-398 is due to its role on COX-2 inhibition.

Other studies have shown that the radiosensitivity of PC3 (human prostate carcinoma cells) and Hela (human cervical carcinoma cells) was enhanced after silencing of COX-2 by siRNA. NS-398 was able to increase radiosensitivity of PC3 cells expressing COX-2, but not in PC3 silenced for COX-2. In contrast, NS-398 enhanced radiosensitivity of Hela cells, irrespective to the level of COX-2 [37].

However, combination of COX-2 inhibitors with radiation therapy can also lead to a reduction of efficiency of the radiotherapy. In one report, it has been shown that the

selective COX-2 inhibitor nimesulide decreased radiation efficiency of two head-and-neck cancer cells lines (SCC9 and SCC25) which are COX-2 positive [139]. This suggests that the sensitization of tumor cells to radiation might be strongly dependent on tumor cell type.

6.2. COX-2 Inhibitors in Combination with Chemotherapy. Many types of cancer are treated with chemotherapeutic agents leading to inhibition of cell proliferation or induction of apoptosis [140].

One of the major causes of chemotherapy failure is the survival and/or development of multidrug resistant cancer cells. This resistance is mediated by many mechanisms including over-expression of proteins involved in inhibition of apoptosis (i.e, Bcl-2), leading to insensitivity of tumor cells to apoptotic stimuli; an up-regulation of DNA repair; alteration of the target; up-regulation of detoxification enzymes (i.e., Glutathione S-transferases); and extrusion of chemotherapeutic drugs by overexpression of ATP-binding cassette family proteins, such as MRP (multidrug resistant-associated protein) BCRP (breast cancer resistance protein or mitoxantrone resistance protein) because these proteins regulate absorption, distribution, and excretion of various pharmacologic compounds [141]. Consequently, the chemotherapeutic agents are immediately extruded from the cells. P-gp (P-glycoprotein) is one of the best-understood mechanisms leading to multidrug resistance (MDR). Tremendous efforts have been made to find solutions to overcome MDR. Recently, COX-2 inhibitors showed an ability to sensitize tumor cells to chemotherapeutic agents in several models and also in clinical assays. Colorectal cancers are particularly affected by chemoresistance. One study revealed that the COXs inhibitors naproxen and indomethacin heptyl ester were able to downregulate P-glycoprotein in human colorectal CACO-2 cell line. [39]. Indomethacin inhibited the activity of the protein and affected COX-2 mRNA and protein level [39]. Another study showed that meloxicam was able to downregulate MDR1 in HL60 (a human promyelocytic leukemia) cell line as well as in acute myeloid leukemic blasts [142]. The regulation of MDR1 by COX-2 has been also suggested in another study [143] in which it was reported that transfection of COX-2 cDNA with adenovirus in renal rat mesangial cells led to an upregulation of MDR1 gene. The combination of COX-2 inhibitors with chemotherapy was also assayed in a study in which the sensitivity of a human gastric cancer cell line MKN45 to cisplatin (alkylating agent) resulted increased by COX-2 downregulation with siRNA [35], suggesting a possible therapeutic application of this combination. Similarly, the sensitivity to cisplatin was increased by celecoxib in a human osteosarcoma cell line (MG-63) and this effect was linked to a down-regulation of anti-apoptotic proteins survivin, Bcl-2, and an inhibition of the survival pathway PI3K/Akt [112]. It was also reported that B-CLL (B chronic lymphoid leukemia) overexpressed COX-2 and the combination of NS398 with chlorambucil, an alkylating agent, increased the level of apoptosis in B-CLL blasts coming from patients [32]. Moreover, several lymphoma cell lines overexpressed COX-2, such as RAJI, BJAB, BL41 and treatment of these cells with celecoxib led to a decrease of cell proliferation in a dose-dependent manner [34].

NS-398 was able to increase the cytotoxicity of gemcitabine, an analog of the antimetabolite nucleoside deoxycytidine, used for treatment of nonsmall cell lung carcinoma, in A549ACA cell line (lung adenocarcinoma cell line) by enhancing apoptosis [144]. The combination of NS-398 and gemcitabine is also associated with an inhibition of cell proliferation with an accumulation of the cells in G0/G1 phase of cell cycle and an increase of p21 [144].

All of these data suggest that COX-2 is implicated in anti-apoptotic and MDR pathways and that selective COX-2 inhibitors could be used to improve chemotherapy efficiency.

6.3. COX-2 Inhibitors in Combination with Photodynamic Therapy. An alternative therapeutic approach to treat cancers is photodynamic therapy. This procedure is particularly used for such solid tumors including skin, bladder, and head and neck cancers in addition to other diseases like age-related macular degeneration and psoriasis [145]. The treatment consists in the administration of a photosensitizer, a molecule that selectively accumulates in tumors and is activated by light (600–850 nm). The photosensitizers may accumulate in different compartments of tumor cells like mitochondria (i.e., porphycene monomer), nucleus, lysosomes (i.e., lysyl chlorin p6), and plasma membrane (i.e., monocationic porphyrin like Photofrin). Then, the photosensitizer is excited with a laser from a single state to a triplet state. The triplet-state photosensitizer is implicated in two oxygen-dependent reactions. In the first one, the triplet can react with cell membrane or molecules, leading to radical formation, which in combination with oxygen produce oxygenated products, cytotoxic for the cells [146, 147]. In the second reaction, the triplet-state photosensitizer can transfer its energy directly to oxygen in order to produce singlet oxygen (^{1}02), which is known to be a very highly reactive oxygen species and is implicated in cell damage. Therefore, this therapy leads to tumor destruction due to cell death occurring *via* apoptosis and necrosis. Vasculature damages and activation of immune response are two important effects implicated in tumor ablation.

Some parameters affect PDT efficiency, such as the distribution of the photosensitizer, photobleaching, hypoxia/anoxia, and the vascularization of the tumor [146]. The main reason of failure of this therapeutic approach is linked to an up-regulation of angiogenic and inflammatory factors in the tumor microenvironment that strongly reduces the PTD efficiency with a consequent tumor relapse. The link between inflammation and survival pathway activation, cell proliferation, and angiogenesis is well known and contributes to tumor progression [3, 6]. It has been shown that PDT leads to an increase of TNFα, IL1β, PGE2, VEGF (vascular endothelial growth factor), and MMP9 (matrix metalloproteinase 9) [147]. These molecules can counteract tumor responses to PTD by promoting cell proliferation and cell survival [38]. Interestingly, it has been demonstrated that COX-2 is upregulated during PDT treatment in different cancer models. As for radiotherapy and chemotherapy,

this suggests COX-2 as a possible target to increase PDT efficiency.

Indeed, celecoxib has been proved to affect the Photofrin-induced PDT in in vitro and in vivo studies performed on a mouse mammary carcinoma BA cell line [148]. In vitro, celecoxib and NS-398 increase PDT-induced apoptosis. These results were correlated with caspase-3 and PARP cleavage and Bcl-2 degradation. In vivo, the photosensitization by COX-2 inhibitors was not due to apoptosis exacerbation. Interestingly, celecoxib and NS-398 decrease PDT-induced apoptosis but were also able to decrease the level of angiogenic factors such as TNFα, IL1β, PGE2, VEGF, and MMP9 [148].

Upon chlorin-induced PDT, COX-2 was found up-regulated 25-fold in mouse mammary carcinoma RIF cells [149]. This up-regulation was associated with an increase of PGE2 level in the tumor microenvironment. When RIF cells were transplanted in CH3/HeJ mice, for in vivo studies, PDT similarly induced an increase of COX-2 and PGE2. These effects were prevented by NS-398. Here, it was demonstrated that PDT induced vascular endothelial growth factor expression (VEGF) and this increase was attenuated by treating mice with NS-398, meaning that COX-2 might play a role also in angiogenesis. In consequence of these effects, the combination of COX-2 inhibitors with PDT resulted in an increased efficiency of tumor treatment.

Possible correlation between COX-2 level and resistance to PDT has been also investigated in Hela (human cervix carcinoma cells) and T24 (human transitional cell carcinoma of the urinary bladder) cells [150]. It has been reported that in PDT induced by hypericin, a natural photosensitizer which accumulates in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, an increase of PGE2 levels occurred. Hypericin induces apoptosis by triggering the release of cytochrome *c* after light excitation through a process requiring the activation of p38 MAPK, which it is known to induce an up-regulation of COX-2 [23, 151]. The increase in PGE2 levels was prevented by the use of a p38 MAPK inhibitor (PD169316). Moreover, the impairment of p38 MAPK was associated with an increase in the susceptibility of tumor cells to PDT. However, COX-2 inhibitors did not lead to the same effect, meaning that COX-2 was not involved in PDT resistance in this model.

In contrast to the study of Ferrario et al. [148, 149], a report from Makowski et al. [152] has revealed that rofecoxib, NS-398, and nimesulide were unable to potentiate PDT in C-26 cells (poorly differentiated colon adenocarcinoma cell line) in vitro. However, chronic exposition of mice bearing C-26 cells to nimesulide potentiated PDT. These data suggest that COX-2 inhibitors may indirectly potentiate PDT.

It is known that vasculature damages are important for PDT efficiency and that COX-2 inhibitors act as anti-angiogenic factors [153]. It has been hypothesized that these antiangiogenic effects could be responsible for the anti-tumor effect.

Currently, the link between COX-2 and PDT efficiency is not well characterized. Some studies have revealed an improvement of efficiency with COX-2 inhibitors whereas other reports have demonstrated no direct effects. In any case, this effect may be cell-type dependent as for chemotherapy or radiotherapy.

7. Inhibition of COX-2 Expression by Natural Compounds

Synthetic cyclooxygenase-2 inhibitors hold promise for cancer chemoprevention; however, recent toxicity problems suggest that new strategies are needed. Natural compounds with the potential to inhibit key cell signaling pathways including COX-2 gained much attention over the last regarding years whether they are used alone or in combination with existing chemotherapeutic agents.

Recently, Bhui et al. demonstrated that Bromelain, a pharmacologically active compound present in pineapple (Ananas cosmosus), leads to a marked inhibition of COX-2 expression and inactivation of NFκB. Bromelain treatment induces up-regulation of p53 and Bax and subsequent activation of caspase-3 and caspase-9 with a decrease in Bcl-2 expression [154]. Furthermore bromelain induces apoptosis-related proteins along with inhibition of NFκB -driven COX-2 expression by blocking the MAPK and Akt/protein kinase B signaling in DMBA-TPA-induced mouse skin tumors [155].

Curcumin, a naturally occurring polyphenol from Curcuma longa, was described to act as an antiinflammatory and antiproliferative agent by causing downregulation of COX-2 in cervical cancer. Curcumin-mediated apoptosis in these cells is initiated by up-regulation of pro-apoptotic Bax, AIF, release of cytochrome *c,* and downregulation of anti-apoptotic Bcl-2, Bcl-xL in HeLa and SiHa cell lines. This onset of apoptosis was accompanied by an increase in caspase-3 and -9 activity, suggesting the role of mitochondria in curcumin-mediated apoptotic cell death as described by M. Singh and N. Singh [156]. Marín et al., furthermore, concluded that curcumin inhibits NFκB activity as well as the expression of its downstream target genes, and also selectively induces apoptosis of melanoma cells but not normal melanocytes [157]. In addition, curcumin-induced apoptosis was also associated with the activation of caspase-3 and caspase-9, and the degradation of PARP. Curcumin decreased the expression levels of COX-2 mRNA and protein without causing significant changes in COX-1 levels, which was correlated with the inhibition of prostaglandin E(2) synthesis [158]. In BV-2 microglial cells, curcumin and analogs were shown to inhibit LPS-induced COX-2 expression; analogs identified as more potent than curcumin in the screening assay were also more potent than curcumin in preventing COX-2 expression [159].

Coumarin (1,2-benzopyrone) is a naturally occurring fragrant compound found in numerous plants and spices. Results obtained with human nonsmall cell lung cancer A549 cells suggest that downregulation of Bcl-xL, COX-2, and MAP kinase pathway and up-regulation of p53, Akt, and NFκB pathway are involved in the underlying molecular mechanism of apoptosis induction as suggested by Goel et al. [160].

Suh et al. concluded that the plant flavonoid fisetin induces apoptosis and suppresses the growth of colon cancer cells

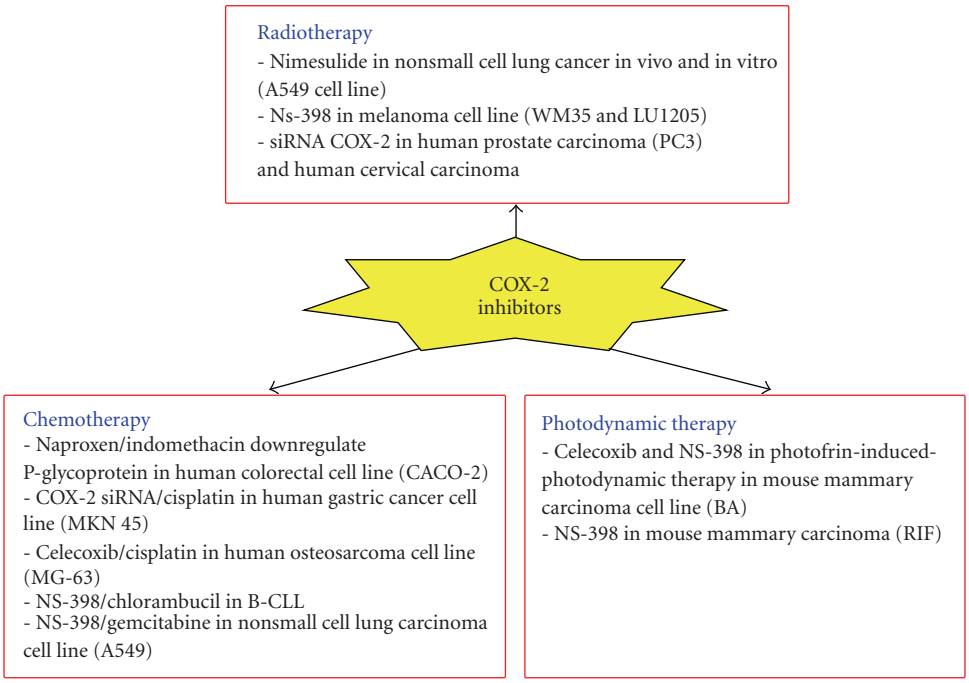


Figure 5: *COX-2 inhibition in cancer therapy.*

by inhibition of COX-2- and Wnt/EGFR/NFκB-signaling pathways [161].

Sulforaphane (SFN) is a biologically active compound extracted from cruciferous vegetables, and presents potent anti-cancer and anti-inflammatory activities by suppression of NFkB-dependent genes involved in anti-apoptotic signaling (IAP-1, IAP-2, XIAP, Bcl-2, and Bcl-xL), cell proliferation (c-Myc, COX-2, and cyclin D1), and metastasis (VEGF and MMP-9) as published by Moon et al. [162].

Nontoxic apigenin can suppress anti-apoptotic pathways involving NFκB activation including cFLIP and COX-2 expression as demonstrated by Xu et al. [88]. According to Nam et al., DA-6034, a synthetic derivative of flavonoid Eupatilin, strongly enhanced apoptosis and inhibited the expression of COX-2 and phospho-IKKalpha in inflammation-related colon cancer models [163].

EGCG from green tea was described to attenuate the AR, to downregulate IGF-1, to modulate COX-2 expression, and to decrease MAPK signaling leading to the reduction in cell proliferation and induction of apoptosis in prostate cancer without toxicity [164]. Interestingly, combination of EGCG and COX-2 inhibitor NS-398 enhanced cell growth inhibition, apoptosis induction, expression of Bax, pro-caspase-6, and pro-caspase-9, and PARP cleavage, inhibition of PPAR gamma, and inhibition of NFκB compared with the additive effects of the two agents alone, suggesting a possible synergism. In vivo, combination treatment with green tea polyphenols and COX-2 inhibitor celecoxib resulted in enhanced tumor growth inhibition, lowering of prostate-specific antigen levels, lowering of IGF-I levels, and circulating levels of serum IGF-1 binding protein-3 compared with results of single-agent treatment. Accordingly, Adhami et al. postulate the efficiency of synergistic and/or additive effects of combinatorial chemopreventive agents and further underscore the need for rational design of human clinical trials involving such natural compounds [165].

Pandey et al. published that butein inhibited the expression of the NFκB-regulated gene products involved in anti-apoptosis (IAP2, Bcl-2, and Bcl-xL), proliferation (cyclin D1 and c-Myc), and invasion (COX-2 and MMP-9). Suppression of these gene products correlated with enhancement of the apoptosis induced by TNF and chemotherapeutic agents, and inhibition of cytokine-induced cellular invasion. This group clearly demonstrates that antitumor and anti-inflammatory activities assigned to butein may be mediated in part through the direct inhibition of IKK, leading to the suppression of the NFκB activation pathway [166].

Hostanska et al. used human colon COX-2-positive HT 29 and COX-2-negative HCT 116 or lung COX-2 proficient A 549 and low COX-2 expressing SW2 cells and showed that willow bark extract BNO 1455 and its fractions inhibit the cell growth and promote apoptosis in human colon and lung cancer cell lines irrespective of their COX selectivity [167].

8. COX-2 Independent Effects

It is currently well known that several selective COX-2 inhibitors inhibit cell proliferation and induce apoptosis independently of COX-2. Celecoxib is particularly known to have these COX-2-independent effects, which were reviewed by Grosch et al. [68]. Indeed, celecoxib was able to directly bind and inhibit PKB/Akt, which plays an important role in cell proliferation and in apoptosis. Concerning cell cycle, PKB is able to phosphorylate cdk inhibitors, such as p21 and p27, leading to PCNA activation [168, 169]. Furthermore, PKB can also activate several cyclin-cdk complexes and

induce E2F factor in some cases [68], stimulating cell proliferation. Besides, PKB inhibits apoptosis, by phosphorylating the pro-apoptotic protein Bad and by inhibiting caspase-9 cleavage [51].

The COX-2-independent effects concern also the extrinsic apoptotic pathway. Indeed, we discussed that selective COX-2 inhibitors, such as NS-398, celecoxib, and meloxicam, are able to modulate the sensitivity of several tumor cells to Fas- and TRAIL-induced apoptosis. It has been discussed that this modulation could be due to COX-2-independent effects. In fact, NS-398 and nimesulide were able to promote TNF and TRAIL-induced apoptosis of D98 and H21 Hela cell lines [170]. In D98, COX-2 is inactive. Moreover, prostaglandin E2 readdition was not able to revert the sensitization effect. In the same report, it has been shown that NS-398 was able to promote apoptosis induced by TNF in MCF-7 cell line (human breast adenocarcinoma cells), which again does not express COX-2 [170].

A report from Ryan et al. [171] demonstrated that SC58125 and CAY10404, two selective COX-2 inhibitors, were able to decrease intracellular content of GSH in malignant human B-cells. This effect was accompanied by an increase of reactive oxygen species production. Indeed, GSH is the most important intracellular nonprotein thiol antioxidant defense against free radicals, meaning that it protects the cells from cellular damages. The GSH depletion was correlated in this study with a reduced survival for these cells.

The fact that many studies imply an association between COX-2 inhibition and apoptosis induction or cell proliferation inhibition, without assessing whether COX-2 activity is effectively decreased, suggests caution in the interpretation of the data. This is confirmed by the observation that different COX-2 inhibitors may trigger apoptosis in the same cancer cell model by modulating different mechanisms. For example, celecoxib [113] induced apoptosis by an inhibition of Akt phosphorylation in prostate cancer cells COX-2-positive LNCaP without affecting Bcl-2 level. In contrast, a study by Liu et al. [102] revealed that NS-398 in the same cell line was able to induce apoptosis but down-regulation of Bcl-2. These results suggest a possible COX-2-independent effect and strongly recommends considering in parallel other experimental strategies to ascertain the effective role of COX-2 in human malignancies [33], such as methodologies based on RNA interference or antisense oligonucleotides. Studies have already suggested these alternative methods. It has been shown that the sensitivity of a human gastric cancer cell line MKN45 to cisplatin (alkylating agent) was increased by COX-2 downregulation with siRNA [35].

9. Conclusion

A number of studies suggest that COX-2 inhibition may lead to an inhibition of cell proliferation in different cancer types. The fact that COX-2 inhibition may per se trigger apoptosis of tumor cells and/or sensitize them to cytotoxic treatments is an indication that COX-2 may be a good target in cancer therapy, in order to improve the efficiency of tumor cell death and to reduce tumor progression (see Figure 5 for a synthesis). Accordingly, the combination of selective COX-2 inhibitors with radiotherapy or different chemotherapeutics revealed a sensitization to apoptosis. This effect was also observed with several agents inducing apoptosis in a physiological way, thus suggesting that COX-2 inhibitors used in combination with death receptors agonists might be a novel approach to elicit apoptosis of cancer cells. However, the fact that COX-2 inhibitors can mediate their effects by COX-2-independent mechanisms suggests caution in the interpretation of the data.

Nowadays, selective COX-2 inhibitors have been included in several clinical assays. Some of them effectively increase the efficiency of radiotherapy and chemotherapy [172]. For example, celecoxib is in a clinical phase II assay in combination with Paclitaxel, carboplatin, and radiotherapy for patients with inoperable stage IIIA/B nonsmall cell lung cancer [172]. These clinical assays confirm that COX-2 inhibition may be a promising field in cancer treatment. However, the selective COX-2 inhibitors are responsible for side effects, including an increasing risk of cardiovascular complications [67, 68]. It is hoped that other methods to inhibit COX-2 will be developed. To this purpose, RNA interference using vehicle (i.e., adenovirus) as well as natural compounds were suggested by some studies [35, 76], as alternative and promising strategy.

Conflicts of Interest

The authors have no actual or potential conflict of interest.

Acknowledgments

C. Sobolewski. and C. Cerella are recipients of doctoral and postdoctoral Télévie gtrants, respectively. Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by "Recherche Cancer et Sang" foundation, by the "Recherches Scientifiques Luxembourg" association, by "Een Haerz fir kriibskrank Kanner" association, by the Action Lions "Vaincre le Cancer"association and by Télévie Luxembourg. The authors are particularly grateful to Fonds National pour la Recherche (FNR) Luxembourg, for additional financial support provided for this publication.

References

[1] V. I. Kulinsky, "Biochemical aspects of inflammation," *Biochemistry*, vol. 72, no. 6, pp. 595–607, 2007.

[2] R. N. DuBois, S. B. Abramson, L. Crofford, et al., "Cyclooxygenase in biology and disease," *FASEB Journal*, vol. 12, no. 12, pp. 1063–1073, 1998.

[3] F. Balkwill and A. Mantovani, "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *The Lancet*, vol. 357, no. 9255, pp. 539–545, 2001.

[4] L. K. Dennis, C. F. Lynch, and J. C. Torner, "Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer," *Urology*, vol. 60, no. 1, pp. 78–83, 2002.

[5] L. R. Howe, "Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer," *Breast Cancer Research*, vol. 9, no. 4, p. 210, 2007.

[6] L. M. Coussens and Z. Werb, "Inflammation and cancer," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 860–867, 2002.

[7] M. Suganuma, S. Okabe, M. W. Marino, A. Sakai, E. Sueoka, and H. Fujiki, "Essential role of tumor necrosis factor α (TNF-α) in tumor promotion as revealed by TNF-α-deficient mice," *Cancer Research*, vol. 59, no. 18, pp. 4516–4518, 1999.

[8] M. Yao, E. C. Lam, C. R. Kelly, W. Zhou, and M. M. Wolfe, "Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 90, no. 3, pp. 712–719, 2004.

[9] R. N. DuBois and W. E. Smalley, "Cyclooxygenase, NSAIDs, and colorectal cancer," *Journal of Gastroenterology*, vol. 31, no. 6, pp. 898–906, 1996.

[10] A. L. Eisinger, S. M. Prescott, D. A. Jones, and D. M. Stafforini, "The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer," *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, vol. 82, no. 1–4, pp. 147–154, 2007.

[11] G. Steinbach, P. M. Lynch, R. K. S. Phillips, et al., "The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 342, no. 26, pp. 1946–1952, 2000.

[12] S. P. Hussain and C. C. Harris, "Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials," *International Journal of Cancer*, vol. 121, no. 11, pp. 2373–2380, 2007.

[13] S. Cristofanon, F. Morceau, A. I. Scovassi, M. Dicato, L. Ghibelli, and M. Diederich, "Oxidative, multistep activation of the noncanonical NF-κB pathway via disulfide Bcl-3/p50 complex," *FASEB Journal*, vol. 23, pp. 45–57, 2009.

[14] R. Chen, A. B. Alvero, D. A. Silasi, and G. Mor, "Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 57, no. 2, pp. 93–107, 2007.

[15] M. D'Alessio, C. Cerella, C. Amici, et al., "Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO-resistant cells," *FASEB Journal*, vol. 18, no. 13, pp. 1609–1611, 2004.

[16] W. W. Lin and M. Karin, "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 5, pp. 1175–1183, 2007.

[17] E. Pikarsky, R. M. Porat, I. Stein, et al., "NF-κB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer," *Nature*, vol. 431, no. 7007, pp. 461–466, 2004.

[18] S. T. Palayoor, M. Y. Youmell, S. K. Calderwood, C. N. Coleman, and B. D. Price, "Constitutive activation of IκB kinase α and NF-κB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen," *Oncogene*, vol. 18, no. 51, pp. 7389–7394, 1999.

[19] U. Kordes, D. Krappmann, V. Heissmeyer, W. D. Ludwig, and C. Scheidereit, "Transcription factor NF-κB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells," *Leukemia*, vol. 14, no. 3, pp. 399–402, 2000.

[20] G. Tricot, "New insights into role of microenvironment in multiple myeloma," *The Lancet*, vol. 355, no. 9200, pp. 248–250, 2000.

[21] N. V. Chandrasekharan and D. L. Simmons, "The cyclooxygenases," *Genome Biology*, vol. 5, no. 9, article 241, 2004.

[22] S. Narumiya and G. A. FitzGerald, "Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 108, no. 1, pp. 25–30, 2001.

[23] R. G. Ramsay, D. Ciznadija, M. Vanevski, and T. Mantamadiotis, "Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control," *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol. 16, no. 2, supplement, pp. 59–67, 2003.

[24] B. Hinz and K. Brune, "Cyclooxygenase-2–10 years later," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 300, no. 2, pp. 367–375, 2002.

[25] R. G. Kurumbail, A. M. Stevens, J. K. Gierse, et al., "Structural basis for selective inhibition of cyciooxygenase-2 by anti-inflammatory agents," *Nature*, vol. 384, no. 6610, pp. 644–648, 1996.

[26] F. H. Sarkar, S. Adsule, Y. Li, and S. Padhye, "Back to the future: COX-2 inhibitors for chemoprevention and cancer therapy," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 7, no. 6, pp. 599–608, 2007.

[27] B. Kis, J. A. Snipes, T. Isse, K. Nagy, and D. W. Busija, "Putative cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 23, no. 11, pp. 1287–1292, 2003.

[28] N. V. Chandrasekharan, H. Dai, K. L. T. Roos, et al., "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 21, pp. 13926–13931, 2002.

[29] B. Hinz, O. Cheremina, and K. Brune, "Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man," *FASEB Journal*, vol. 22, no. 2, pp. 383–390, 2008.

[30] Y. Cao and S. M. Prescott, "Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 190, no. 3, pp. 279–286, 2002.

[31] A. Ristimaki, A. Sivula, J. Lundin, et al., "Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer," *Cancer Research*, vol. 62, no. 3, pp. 632–635, 2002.

[32] P. Secchiero, E. Barbarotto, A. Gonelli, et al., "Potential pathogenetic implications of cyclooxygenase-2 overexpression in B chronic lymphoid leukemia cells," *American Journal of Pathology*, vol. 167, no. 6, pp. 1599–1607, 2005.

[33] Y. Nakanishi, R. Kamijo, K. Takizawa, M. Hatori, and M. Nagumo, "Inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) suppressed the proliferation and differentiation of human leukaemia cell lines," *European Journal of Cancer*, vol. 37, no. 12, pp. 1570–1578, 2001.

[34] T. Wun, H. McKnight, and J. M. Tuscano, "Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma," *Leukemia Research*, vol. 28, no. 2, pp. 179–190, 2004.

[35] M. W. Chan, C. Y. Wong, A. S. Cheng, et al., "Targeted inhibition of COX-2 expression by RNA interference suppresses tumor growth and potentiates chemosensitivity to cisplatin in human gastric cancer cells," *Oncology Reports*, vol. 18, no. 6, pp. 1557–1562, 2007.

[36] G. E. Johnson, V. N. Ivanov, and T. K. Hei, "Radiosensitization of melanoma cells through combined inhibition of protein regulators of cell survival," *Apoptosis*, vol. 13, no. 6, pp. 790–802, 2008.

[37] S. T. Palayoor, M. J. Arayankalayil, A. Shoaibi, and C. N. Coleman, "Radiation sensitivity of human carcinoma cells transfected with small interfering RNA targeted against cyclooxygenase-2," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, no. 19, pp. 6980–6986, 2005.

[38] M. Philip, D. A. Rowley, and H. Schreiber, "Inflammation as a tumor promoter in cancer induction," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 14, no. 6, pp. 433–439, 2004.

[39] A. Zrieki, R. Farinotti, and M. Buyse, "Cyclooxygenase inhibitors down regulate P-glycoprotein in human colorectal caco-2 cell line," *Pharmaceutical Research*, vol. 25, no. 9, pp. 1991–2001, 2008.

[40] E. M. Choi, S. J. Kwak, Y. M. Kim, et al., "COX-2 inhibits anoikis by activation of the PI-3K/Akt pathway in human bladder cancer cells," *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 37, no. 3, pp. 199–203, 2005.

[41] R. M. Breyer, C. K. Bagdassarian, S. A. Myers, and M. D. Breyer, "Prostanoid receptors: subtypes and signaling," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 41, pp. 661–690, 2001.

[42] J. Grossmann, "Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis—anoikis"," *Apoptosis*, vol. 7, no. 3, pp. 247–260, 2002.

[43] J. R. Woodgett, "Regulation and functions of the glycogen synthase kinase-3 subfamily," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 5, no. 4, pp. 269–275, 1994.

[44] N. K. Boughton Smith, C. J. Hawkey, and B. J. R. Whittle, "Biosynthesis of lipoxygenase and cyclo-oxygenase products from [14C]-arachidonic acid by human colonic mucosa," *Gut*, vol. 24, no. 12, pp. 1176–1182, 1983.

[45] V. W. Yang, J. M. Shields, S. R. Hamilton, et al., "Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis," *Cancer Research*, vol. 58, no. 8, pp. 1750–1753, 1998.

[46] H. Sheng, J. Shao, J. D. Morrow, R. D. Beauchamp, and R. N. DuBois, "Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E_2 in human colon cancer cells," *Cancer Research*, vol. 58, no. 2, pp. 362–366, 1998.

[47] G. A. Doherty, S. M. Byrne, E. S. Molloy, et al., "Proneoplastic effects of PGE_2 mediated by EP4 receptor in colorectal cancer," *BMC Cancer*, vol. 9, article 207, 2009.

[48] L. Damstrup, S. K. Kuwada, P. J. Dempsey, et al., "Amphiregulin acts as an autocrine growth factor in two human polarizing colon cancer lines that exhibit domain selective EGF receptor mitogenesis," *British Journal of Cancer*, vol. 80, no. 7, pp. 1012–1019, 1999.

[49] Q. B. She, D. B. Solit, Q. Ye, K. E. O'Reilly, J. Lobo, and N. Rosen, "The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells," *Cancer Cell*, vol. 8, no. 4, pp. 287–297, 2005.

[50] T. G. Tessner, F. Muhale, T. E. Riehl, S. Anant, and W. F. Stenson, "Prostaglandin E_2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and Bax translocation," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 114, no. 11, pp. 1676–1685, 2004.

[51] A. Burlacu, "Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 7, no. 3, pp. 249–257, 2003.

[52] T. Yamaki, K. Endoh, M. Miyahara, et al., "Prostaglandin E_2 activates Src signaling in lung adenocarcinoma cell via EP_3," *Cancer Letters*, vol. 214, no. 1, pp. 115–120, 2004.

[53] L. P. Billen, C. L. Kokoski, J. F. Lovell, B. Leber, and D. W. Andrews, "Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax," *PLoS Biology*, vol. 6, no. 6, article e147, 2008.

[54] Z. A. Stewart, M. D. Westfall, and J. A. Pietenpol, "Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 24, no. 3, pp. 139–145, 2003.

[55] M. D. Larrea, J. Liang, T. Da Silva, et al., "Phosphorylation of $p27^{Kip1}$ regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 28, no. 20, pp. 6462–6472, 2008.

[56] M. Pagano, S. W. Tam, A. M. Theodoras, et al., "Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27," *Science*, vol. 269, no. 5224, pp. 682–685, 1995.

[57] J. L. Bos, "ras Oncogenes in human cancer: a review," *Cancer Research*, vol. 49, no. 17, pp. 4682–4689, 1989.

[58] C. Tsatsanis, A. Androulidaki, M. Venihaki, and A. N. Margioris, "Signalling networks regulating cyclooxygenase-2," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 38, no. 10, pp. 1654–1661, 2006.

[59] T. Yano, G. Zissel, J. Muller-Qernheim, S. Jae Shin, H. Satoh, and T. Ichikawa, "Prostaglandin E_2 reinforces the activation of Ras signal pathway in lung adenocarcinoma cells via EP_3," *FEBS Letters*, vol. 518, no. 1–3, pp. 154–158, 2002.

[60] M. R. Junttila and J. Westermarck, "Mechanisms of MYC stabilization in human malignancies," *Cell Cycle*, vol. 7, no. 5, pp. 592–596, 2008.

[61] X. Ma, N. Kundu, S. Rifat, T. Walser, and A. M. Fulton, "Prostaglandin E receptor EP_4 antagonism inhibits breast cancer metastasis," *Cancer Research*, vol. 66, no. 6, pp. 2923–2927, 2006.

[62] M. Majima, I. Hayashi, M. Muramatsu, J. Katada, S. Yamashina, and M. Katori, "Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants," *British Journal of Pharmacology*, vol. 130, no. 3, pp. 641–649, 2000.

[63] J. Folkman, "Tumor angiogenesis: therapeutic implications," *The New England Journal of Medicine*, vol. 285, no. 21, pp. 1182–1186, 1971.

[64] G. A. Green, "Understanding NSAIDs: from aspirin to COX-2," *Clinical Cornerstone*, vol. 3, no. 5, pp. 50–59, 2001.

[65] S. H. Ferreira, S. Moncada, and J. R. Vane, "Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen," *Nature*, vol. 231, no. 25, pp. 237–239, 1971.

[66] S. Pasa, K. Bayan, M. Kucukoner, et al., "The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on platelet function and severity of upper gastrointestinal haemorrhage," *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, vol. 28, no. 1, pp. 83–89, 2009.

[67] M. Hudson, E. Rahme, H. Richard, and L. Pilote, "Risk of congestive heart failure with nonsteroidal antiinflammatory drugs and selective cyclooxygenase 2 inhibitors: a class effect?" *Arthritis Care and Research*, vol. 57, no. 3, pp. 516–523, 2007.

[68] S. Grosch, T. J. Maier, S. Schiffmann, and G. Geisslinger, "Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 98, no. 11, pp. 736–747, 2006.

[69] W. B. White, G. Faich, A. Whelton, et al., "Comparison of thromboembolic events in patients treated with celecoxib, a cyclooxygenase-2 specific inhibitor, versus ibuprofen or diclofenac," *American Journal of Cardiology*, vol. 89, no. 4, pp. 425–430, 2002.

[70] M. E. Farkouh, F. W. A. Verheugt, S. Ruland, et al., "A comparison of the blood pressure changes of lumiracoxib with those of ibuprofen and naproxen," *Journal of Clinical Hypertension*, vol. 10, no. 8, pp. 592–602, 2008.

[71] A. Whelton, J. G. Fort, J. A. Puma, D. Normandin, A. E. Bello, and K. M. Verburg, "Cyclooxygenase-2-specific inhibitors and cardiorenal function: a randomized, controlled trial of celecoxib and rofecoxib in older hypertensive osteoarthritis patients," *American Journal of Therapeutics*, vol. 8, no. 2, pp. 85–95, 2001.

[72] T. Juhlin, S. Björkman, and P. Höglund, "Cyclooxygenase inhibition causes marked impairment of renal function in

elderly subjects treated with diuretics and ACE-inhibitors," *European Journal of Heart Failure*, vol. 7, no. 6, pp. 1049–1056, 2005.

[73] S. Z. Zhao, M. W. Reynolds, J. Lefkowith, A. Whelton, and F. M. Arellano, "A comparison of renal-related adverse drug reactions between rofecoxib and celecoxib, based on the World Health Organization/Uppsala Monitoring Centre safety database," *Clinical Therapeutics*, vol. 23, no. 9, pp. 1478–1491, 2001.

[74] T. P. van Staa, L. Smeeth, I. Persson, J. Parkinson, and H. G. M. Leufkens, "What is the harm—benefit ratio of Cox-2 inhibitors?" *International Journal of Epidemiology*, vol. 37, no. 2, pp. 405–413, 2008.

[75] B. D. De Smet, A. M. Fendrick, J. G. Stevenson, and S. J. Bernstein, "Over and under-utilization of cyclooxygenase-2 selective inhibitors by primary care physicians and specialists: the tortoise and the hare revisited," *Journal of General Internal Medicine*, vol. 21, no. 7, pp. 694–697, 2006.

[76] A. Strillacci, C. Griffoni, E. Spisni, M. C. Manara, and V. Tomasi, "RNA interference as a key to knockdown overexpressed cyclooxygenase-2 gene in tumour cells," *British Journal of Cancer*, vol. 94, no. 9, pp. 1300–1310, 2006.

[77] H. L. Peng, G. S. Zhang, J. H. Liu, F. J. Gong, and R. J. Li, "Dup-697, a specific COX-2 inhibitor, suppresses growth and induces apoptosis on K562 leukemia cells by cell-cycle arrest and caspase-8 activation," *Annals of Hematology*, vol. 87, no. 2, pp. 121–129, 2008.

[78] H. Sheng, J. Shao, S. C. Kirkland, et al., "Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, no. 9, pp. 2254–2259, 1997.

[79] H. Amano, I. Hayashi, H. Endo, et al., "Host prostaglandin E_2-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, no. 2, pp. 221–232, 2003.

[80] H. Hochegger, S. Takeda, and T. Hunt, "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 11, pp. 910–916, 2008.

[81] D. Cobrinik, "Pocket proteins and cell cycle control," *Oncogene*, vol. 24, no. 17, pp. 2796–2809, 2005.

[82] Z. Kelman, "PCNA: structure, functions and interactions," *Oncogene*, vol. 14, no. 6, pp. 629–640, 1997.

[83] W. R. Taylor and G. R. Stark, "Regulation of the G2/M transition by p53," *Oncogene*, vol. 20, no. 15, pp. 1803–1815, 2001.

[84] J. Li, X. Chen, X. Dong, Z. Xu, H. Jiang, and X. Sun, "Specific COX-2 inhibitor, meloxicam, suppresses proliferation and induces apoptosis in human HepG2 hepatocellular carcinoma cells," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 21, no. 12, pp. 1814–1820, 2006.

[85] M. D. Castellone, H. Teramoto, B. O. Williams, K. M. Druey, and J. S. Gutkind, "Prostaglandin E_2 promotes colon cancer cell growth through a G_s-axin-β-catenin signaling axis," *Science*, vol. 310, no. 5753, pp. 1504–1510, 2005.

[86] B. Xin, Y. Yokoyama, T. Shigeto, and H. Mizunuma, "Anti-tumor effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human ovarian cancers," *Pathology and Oncology Research*, vol. 13, no. 4, pp. 365–369, 2007.

[87] C. Falandry, P. A. Canney, G. Freyer, and L. Y. Dirix, "Role of combination therapy with aromatase and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with metastatic breast cancer," *Annals of Oncology*, vol. 20, no. 4, pp. 615–620, 2009.

[88] X. F. Xu, C. G. Xie, X. P. Wang, et al., "Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo," *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, vol. 215, no. 2, pp. 149–157, 2008.

[89] G. S. Zhang, D. S. Liu, C. W. Dai, and R. J. Li, "Antitumor effects of celecoxib on K562 leukemia cells are mediated by cell-cycle arrest, caspase-3 activation, and downregulation of Cox-2 expression and are synergistic with hydroxyurea or imatinib," *American Journal of Hematology*, vol. 81, no. 4, pp. 242–255, 2006.

[90] S. Dimmeler, K. Breitschopf, J. Haendeler, and A. M. Zeiher, "Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 189, no. 11, pp. 1815–1822, 1999.

[91] G. Majno and I. Joris, "Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death," *American Journal of Pathology*, vol. 146, no. 1, pp. 3–15, 1995.

[92] J. F. Fullard, A. Kale, and N. E. Baker, "Clearance of apoptotic corpses," *Apoptosis*, vol. 14, no. 8, pp. 1029–1037, 2009.

[93] S. Shimohama, "Apoptosis in Alzheimer's disease—an update," *Apoptosis*, vol. 5, no. 1, pp. 9–16, 2000.

[94] S. Coppola and L. Ghibelli, "GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling," *Biochemical Society Transactions*, vol. 28, no. 2, pp. 56–61, 2000.

[95] D. C. Henshall, D. P. Bonislawski, S. L. Skradski, J. Q. Lan, R. Meller, and R. P. Simon, "Cleavage of bid may amplify caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures," *Neurobiology of Disease*, vol. 8, no. 4, pp. 568–580, 2001.

[96] Y. J. Cha, H. S. Kim, H. Rhim, B. E. Kim, S. W. Jeong, and I. K. Kim, "Activation of caspase-8 in 3-deazaadenosine-induced apoptosis of U-937 cells occurs downstream of caspase-3 and caspase-9 without Fas receptor-ligand interaction," *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 33, no. 4, pp. 284–292, 2001.

[97] L. Ghibelli, C. Fanelli, G. Rotilio, et al., "Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion," *FASEB Journal*, vol. 12, no. 6, pp. 479–486, 1998.

[98] M. D'Alessio, M. De Nicola, S. Coppola, et al., "Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis," *FASEB Journal*, vol. 19, no. 11, pp. 1504–1506, 2005.

[99] L. Zhou and D. C. Chang, "Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis," *Journal of Cell Science*, vol. 121, no. 13, pp. 2186–2196, 2008.

[100] I. Tamm, Y. Wang, E. Sausville, et al., "IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs," *Cancer Research*, vol. 58, no. 23, pp. 5315–5320, 1998.

[101] J. Chai, C. Du, J. W. Wu, S. Kyin, X. Wang, and Y. Shi, "Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO," *Nature*, vol. 406, no. 6798, pp. 855–862, 2000.

[102] X. H. Liu, S. Yao, A. Kirschenbaum, and A. C. Levine, "NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates Bcl-2 expression in LNCaP cells," *Cancer Research*, vol. 58, no. 19, pp. 4245–4249, 1998.

[103] Y. Cao, A. T. Pearman, G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, and S. M. Prescott, "Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 21, pp. 11280–11285, 2000.

[104] S. Jayadev, C. M. Linardic, and Y. A. Hannun, "Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor α," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 8, pp. 5757–5763, 1994.

[105] B. J. Pettus, C. E. Chalfant, and Y. A. Hannun, "Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1585, no. 2-3, pp. 114–125, 2002.

[106] T. A. Chan, P. J. Morin, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler, "Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 2, pp. 681–686, 1998.

[107] B. Brüne, A. von Knethen, and K. B. Sandau, "Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis," *Cell Death and Differentiation*, vol. 6, no. 10, pp. 969–975, 1999.

[108] Y. W. E. Chang, R. Jakobi, A. McGinty, M. Foschi, M. J. Dunn, and A. Sorokin, "Cyclooxygenase 2 promotes cell survival by stimulation of dynein light chain expression and inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 22, pp. 8571–8579, 2000.

[109] L. M. S. Lau, J. K. Wolter, J. T. M. L. Lau, et al., "Cyclooxygenase inhibitors differentially modulate p73 isoforms in neuroblastoma," *Oncogene*, vol. 28, no. 19, pp. 2024–2033, 2009.

[110] M. S. Irwin and F. D. Miller, "p73: regulator in cancer and neural development," *Cell Death and Differentiation*, vol. 11, supplement 1, pp. S17–S22, 2004.

[111] N. Kim, C. H. Kim, D. W. Ahn, et al., "Anti-gastric cancer effects of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, through inhibition of Akt signaling," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 24, no. 3, pp. 480–487, 2009.

[112] B. Liu, Z. l. Shi, J. Feng, and H. M. Tao, "Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 via down-regulation of PI3K/Akt," *Cell Biology International*, vol. 32, no. 5, pp. 494–501, 2008.

[113] A. L. Hsu, T. T. Ching, D. S. Wang, X. Song, V. M. Rangnekar, and C. S. Chen, "The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 15, pp. 11397–11403, 2000.

[114] S. Honjo, M. Osaki, T. D. Ardyanto, T. Hiramatsu, N. Maeta, and H. Ito, "COX-2 inhibitor, NS398, enhances fas-mediated apoptosis via modulation of the PTEN-Akt pathway in human gastric carcinoma cell lines," *DNA and Cell Biology*, vol. 24, no. 3, pp. 141–147, 2005.

[115] J. Y. Liou, D. Ghelani, S. Yeh, and K. K. Wu, "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by suppressing 14-3-3ε," *Cancer Research*, vol. 67, no. 7, pp. 3185–3191, 2007.

[116] Y. Yamamoto, M. J. Yin, K. M. Lin, and R. B. Gaynor, "Sulindac inhibits activation of the NF-κB pathway," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 38, pp. 27307–27314, 1999.

[117] B. Poligone and A. S. Baldwin, "Positive and negative regulation of NF-κB by COX-2: roles of different prostaglandins," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 42, pp. 38658–38664, 2001.

[118] M. K. Park, Y. J. Kang, Y. M. Ha, et al., "EP_2 receptor activation by prostaglandin E_2 leads to induction of HO-1 via PKA and PI3K pathways in C6 cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 379, no. 4, pp. 1043–1047, 2009.

[119] S. Martin, D. C. Phillips, K. Szekely-Szucs, L. Elghazi, F. Desmots, and J. A. Houghton, "Cyclooxygenase-2 inhibition sensitizes human colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through clustering of DR5 and concentrating death-inducing signaling complex components into ceramide-enriched caveolae," *Cancer Research*, vol. 65, no. 24, pp. 11447–11458, 2005.

[120] R. Tang, A.-M. Faussat, J.-Y. Perrot, et al., "Zosuquidar restores drug sensitivity in P-glycoprotein expressing acute myeloid leukemia (AML)," *BMC Cancer*, vol. 8, article 51, 2008.

[121] Y. Yamanaka, K. Shiraki, T. Inoue, et al., "COX-2 inhibitors sensitize human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 18, no. 1, pp. 41–47, 2006.

[122] M. Casado, B. Molla, R. Roy, et al., "Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes," *Hepatology*, vol. 45, no. 3, pp. 631–638, 2007.

[123] U. C. Nzeako, M. E. Guicciardi, J. H. Yoon, S. F. Bronk, and G. J. Gores, "COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells," *Hepatology*, vol. 35, no. 3, pp. 552–559, 2002.

[124] S. M. Frisch and E. Ruoslahti, "Integrins and anoikis," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 9, no. 5, pp. 701–706, 1997.

[125] F. G. Giancotti and E. Ruoslahti, "Integrin signaling," *Science*, vol. 285, no. 5430, pp. 1028–1032, 1999.

[126] R. R. Joseph, E. Yazer, Y. Hanakawa, and A. W. Stadnyk, "Prostaglandins and activation of AC/cAMP prevents anoikis in IEC-18," *Apoptosis*, vol. 10, no. 6, pp. 1221–1233, 2005.

[127] S. Kanayama, Y. Yamada, R. Kawaguchi, Y. Tsuji, S. Haruta, and H. Kobayashi, "Hepatocyte growth factor induces anoikis resistance by up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in uterine endometrial cancer cells," *Oncology Reports*, vol. 19, no. 1, pp. 117–122, 2008.

[128] L. Beviglia, K. Matsumoto, C. S. Lin, B. L. Ziober, and R. H. Kramer, "Expression of the c-Met/HGF receptor in human breast carcinoma: correlation with tumor progression," *International Journal of Cancer*, vol. 74, no. 3, pp. 301–309, 1997.

[129] G. Dong, Z. Chen, Z. Y. Li, N. T. Yeh, C. C. Bancroft, and C. Van Waes, "Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma," *Cancer Research*, vol. 61, no. 15, pp. 5911–5918, 2001.

[130] S. Wagatsuma, R. Konno, S. Sato, and A. Yajima, "Tumor angiogenesis, hepatocyte growth factor, and c-Met expression in endometrial carcinoma," *Cancer*, vol. 82, no. 3, pp. 520–530, 1998.

[131] Q. Zeng, L. K. McCauley, and C. Y. Wang, "Hepatocyte growth factor inhibits anoikis by induction of activator protein 1-dependent cyclooxygenase-2: implication in head and neck squamous cell carcinoma progression," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 51, pp. 50137–50142, 2002.

[132] M. C. Maiuri, E. Zalckvar, A. Kimchi, and G. Kroemer, "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 9, pp. 741–752, 2007.

[133] C. Bauvy, P. Gane, S. Arico, P. Codogno, and E. Ogier-Denis, "Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the

human intestinal colon cancer cell line HT-29," *Experimental Cell Research*, vol. 268, no. 2, pp. 139–149, 2001.

[134] P. M. Lynch, "COX-2 inhibition in clinical cancer prevention," *Oncology*, vol. 15, no. 3, supplement 5, pp. 21–26, 2001.

[135] N. Arber, "Cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer prevention: point," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 17, no. 8, pp. 1852–1857, 2008.

[136] B. Arun and P. Goss, "The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention," *Seminars in Oncology*, vol. 31, supplement 7, pp. 22–29, 2004.

[137] D. W. Bell, J. M. Varley, T. E. Szydlo, et al., "Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome," *Science*, vol. 286, no. 5449, pp. 2528–2531, 1999.

[138] K. R. Grimes, G. W. Warren, F. Fang, Y. Xu, and W. H. St Clair, "Cyclooxygenase-2 inhibitor, nimesulide, improves radiation treatment against non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo," *Oncology Reports*, vol. 16, no. 4, pp. 771–776, 2006.

[139] C. Czembirek, C. Eder-Czembirek, B. M. Erovic, et al., "The cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide, a nonsteroidal analgesic, decreases the effect of radiation therapy in head-and-neck cancer cells," *Strahlentherapie und Onkologie*, vol. 185, no. 5, pp. 310–317, 2009.

[140] B. A. Chabner and T. G. Roberts Jr., "Chemotherapy and the war on cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 1, pp. 65–72, 2005.

[141] Y. A. Luqmani, "Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy," *Medical Principles and Practice*, vol. 14, supplement 1, pp. 35–48, 2005.

[142] U. Puhlmann, C. Ziemann, G. Ruedell, et al., "Impact of the cyclooxygenase system on doxorubicin-induced functional multidrug resistance 1 overexpression and doxorubicin sensitivity in acute myeloid leukemic HL-60 cells," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 312, no. 1, pp. 346–354, 2005.

[143] V. A. Patel, M. J. Dunn, and A. Sorokin, "Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 41, pp. 38915–38920, 2002.

[144] X. J. Chen, W. Xiao, X. Qu, and S. Y. Zhou, "NS-398 enhances the efficacy of gemcitabine against lung adenocarcinoma through up-regulation of $p21^{WAF1}$ and $p27^{KIP1}$ protein," *Neoplasma*, vol. 55, no. 3, pp. 200–204, 2008.

[145] T. J. Dougherty, "An update on photodynamic therapy applications," *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, vol. 20, no. 1, pp. 3–7, 2002.

[146] D. E. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 380–387, 2003.

[147] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, et al., "Photodynamic therapy," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, pp. 889–905, 1998.

[148] A. Ferrario, A. M. Fisher, N. Rucker, and C. J. Gomer, "Celecoxib and NS-398 enhance photodynamic therapy by increasing in vitro apoptosis and decreasing in vivo inflammatory and angiogenic factors," *Cancer Research*, vol. 65, no. 20, pp. 9473–9478, 2005.

[149] A. Ferrario, K. Von Tiehl, S. Wong, M. Luna, and C. J. Gomer, "Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response," *Cancer Research*, vol. 62, no. 14, pp. 3956–3961, 2002.

[150] N. Hendrickx, C. Volanti, U. Moens, et al., "Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 52, pp. 52231–52239, 2003.

[151] M. Lasa, K. R. Mahtani, A. Finch, G. Brewer, J. Saklatvala, and A. R. Clark, "Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 12, pp. 4265–4274, 2000.

[152] M. Makowski, T. Grzela, J. Niderla, et al., "Inhibition of cyclooxygenase-2 indirectly potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 14, pp. 5417–5422, 2003.

[153] M. Tsujii, S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoka, M. Hori, and R. N. DuBois, "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells," *Cell*, vol. 93, no. 5, pp. 705–716, 1998.

[154] K. Bhui, S. Prasad, J. George, and Y. Shukla, "Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway," *Cancer Letters*, vol. 282, no. 2, pp. 167–176, 2009.

[155] N. Kalra, K. Bhui, P. Roy, et al., "Regulation of p53, nuclear factor κB and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 226, no. 1, pp. 30–37, 2008.

[156] M. Singh and N. Singh, "Molecular mechanism of curcumin induced cytotoxicity in human cervical carcinoma cells," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 325, no. 1-2, pp. 107–119, 2009.

[157] Y. E. Marín, B. A. Wall, S. Wang, et al., "Curcumin downregulates the constitutive activity of NF-κB and induces apoptosis in novel mouse melanoma cells," *Melanoma Research*, vol. 17, no. 5, pp. 274–283, 2007.

[158] C. Park, D. O. Moon, I. W. Choi, et al., "Curcumin induces apoptosis and inhibits prostaglandin E_2 production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 20, no. 3, pp. 365–372, 2007.

[159] W. M. Weber, L. A. Hunsaker, A. M. Gonzales, et al., "TPA-induced up-regulation of activator protein-1 can be inhibited or enhanced by analogs of the natural product curcumin," *Biochemical Pharmacology*, vol. 72, no. 8, pp. 928–940, 2006.

[160] A. Goel, A. K. Prasad, V. S. Parmar, B. Ghosh, and N. Saini, "Apoptogenic effect of 7,8-diacetoxy-4-methylcoumarin and 7,8-diacetoxy-4-methylthiocoumarin in human lung adenocarcinoma cell line: role of NF-κB, Akt, ROS and MAP kinase pathway," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 179, no. 2-3, pp. 363–374, 2009.

[161] Y. Suh, F. Afaq, J. J. Johnson, and H. Mukhtar, "A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-κB-signaling pathways," *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 2, pp. 300–307, 2009.

[162] D. O. Moon, M. O. Kim, S. H. Kang, Y. H. Choi, and G. Y. Kim, "Sulforaphane suppresses TNF-α-mediated activation of NF-κB and induces apoptosis through activation of reactive oxygen species-dependent caspase-3," *Cancer Letters*, vol. 274, no. 1, pp. 132–142, 2009.

[163] S. Y. Nam, J. S. Kim, J. M. Kim, et al., "DA-6034, a derivative of flavonoid, prevents and ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis and inhibits colon carcinogenesis," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 233, no. 2, pp. 180–191, 2008.

[164] C. E. Harper, B. B. Patel, J. Wang, I. A. Eltoum, and C. A. Lamartiniere, "Epigallocatechin-3-gallate suppresses early stage, but not late stage prostate cancer in TRAMP mice:

mechanisms of action," *Prostate*, vol. 67, no. 14, pp. 1576–1589, 2007.

[165] V. M. Adhami, A. Malik, N. Zaman, et al., "Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer cells both in vitro and in vivo," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, no. 5, pp. 1611–1619, 2007.

[166] M. K. Pandey, S. K. Sandur, B. Sung, G. Sethi, A. B. Kunnumakkara, and B. B. Aggarwal, "Butein, a tetrahydroxychalcone, inhibits nuclear factor (NF)-κB and NF-κB-regulated gene expression through direct inhibition of IκBα kinase β on cysteine 179 residue," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 24, pp. 17340–17350, 2007.

[167] K. Hostanska, G. Jurgenliemk, G. Abel, A. Nahrstedt, and R. Saller, "Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells," *Cancer Detection and Prevention*, vol. 31, no. 2, pp. 129–139, 2007.

[168] J. Liang and J. M. Slingerland, "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression," *Cell Cycle*, vol. 2, no. 4, pp. 339–345, 2003.

[169] L. Rössig, A. S. Jadidi, C. Urbich, C. Badorff, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler, "Akt-dependent phosphorylation of p21Cip1 regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 21, no. 16, pp. 5644–5657, 2001.

[170] G. Totzke, K. Schulze-Osthoff, and R. U. Jänicke, "Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition," *Oncogene*, vol. 22, no. 39, pp. 8021–8030, 2003.

[171] E. P. Ryan, T. P. Bushnell, A. E. Friedman, I. Rahman, and R. P. Phipps, "Cyclooxygenase-2 independent effects of cyclooxygenase-2 inhibitors on oxidative stress and intracellular glutathione content in normal and malignant human B-cells," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 57, no. 3, pp. 347–358, 2008.

[172] R. Mutter, B. Lu, D. P. Carbone, et al., "A Phase II study of celecoxib in combination with paclitaxel, carboplatin, and radiotherapy for patients with inoperable stage IIIA/B non-small cell lung cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 6, pp. 2158–2165, 2009.

Biochemical Pharmacology 80 (2010) 1769–1770

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Editorial

Inflammation: Novel arrows for an ancient target

Over 2000 years ago, the Roman encyclopedist and healer, Aulus Cornelius Celsus described acute inflammation in terms of the cardinal signs, *rubor* (redness), *calor* (increased heat), *tumor* (swelling) and *dolor* (pain), to which Galen later added *functio laesa* (loss of function). Along with pain, inflammation is the major mammalian mechanism of defense against trauma and infection. Thus the inflammation is the most frequent and immediate response to external and internal insults including infection, chemicals (reactive oxygen species; ROS), physical stress (*i.e.*, UV light, tissue trauma and cancers) and immune pathologies (autoimmune diseases).

Inflammation causes the activation of cellular and systems components of the immune system including, granulocytes, monocytes, macrophages, lymphocytes and mast cells resulting in the synthesis and/or release of a variety of endogenous mediators e.g., prostaglandins, leukotrienes, cytokines, chemokines, histamine, bradykinin, GCRP, ATP, NO, ROS and complement. These can then activate various downstream signaling pathways to modulate cell proliferation, cell death and differentiation and frequently amplify the response to the initial insult.

This dysregulation of the inflammatory response results in severe pathologies, including cancer, osteoarthritis, diabetes, Alzheimer's disease and neuropathic pain. The potential benefit of anti-inflammatory agents in these disorders has been widely documented with the NSAID (non steroidal anti-inflammatory drug), aspirin being widely used as a prophylactic agent. Many anti-inflammatory agents including both NSAIDs and DMARDs (disease-modifying anti-rheumatic drugs), the latter of which include the various TNF antibodies (etanercept, infliximab, etc.), methotrexate, gold salts, etc. are available. Unfortunately many of these have side effects that significantly limit their use. As a result, newer agents active at novel targets are the focus of major research efforts to discover drugs that have improved efficacy and reduced side effects.

The International Meeting "Inflammation 2010 – Inflammatory Cell Signaling Mechanisms as Therapeutic Targets" held in January 2010 in Luxembourg involved more than 550 leading researchers who discussed their most recent results at the basic and translational research levels not only to address the inflammatory response *per se* but also to discuss progress in finding novel agents to treat diseases like cancer, Alzheimer's and diabetes.

A major part of the meeting was dedicated to the effect of natural compounds on inflammatory cell signaling. The different natural products presented were for the most part molecules with dietary origins many of which are inhibitors of NF-κB function. During the oral presentations, flavonoids, as well as the stilbene, resveratrol were discussed as novel and potent anti-inflammatory agents. Some of the flavonoids presented, e.g., chrysin, genistein and cyanidin, inhibited COX-2 expression. Flavonoids were also characterized as kinase inhibitors with targets that included JNK, ERK, p38MAPK and MEK1. Pharmacological inhibitors of p38MAPK were linked with the induction of heme-oxygenase (HO)-1 in monocytes. HO-1 is induced following inflammation and is regulated by Nrf2 and has potent anti-inflammatory actions mediated via carbon monoxide and bilirubin production. Resveratrol, derived from wine has pleiotropic effects that include inhibition of COX-2, NF-κB, the secretion of pro-inflammatory cytokines e.g., IL-6 and IL-8, cyclin-dependent kinases and superoxide production.

Natural products with dietary origins were also the subject of several poster presentations and included luteolin and chicoric acid, two constituents of dandelion, which can inhibit LPS-induced inflammation in murine macrophages. This effect was tightly related to the inhibition of COX-2, iNOS and the release of TNFα and IL-1β. Daidzein, an isoflavone and phytoestrogen component of soy also inhibits inflammation by targeting NF-κB. Compounds of marine origin including heteronemin, the cembatrienes, diterpenes, flavolactones, naphthopyrones and stelletin were also well represented at the meeting and linked to the inhibition of TNF-α-induced NF-κB activation.

Epigenetic events play a key role in the regulation of gene expression. Indeed epigenetic changes are an early event in tumor development as well as being implicated at each step of tumor progression. Three distinct epigenetic events are currently the subject of research efforts: alterations in the level of DNA methylation, histone modification and, micro RNAs. Inhibitors of DNA methyl transferase (DNMT), which catalyzes the transfer of methyl groups to cytosine at CpG sequences can lead to gene silencing. Similarly histone deacetylase (HDAC) inhibitors can prevent deacetylation of lysine residues in histone tails also leading to inactivation of gene expression. Such mechanisms thus represent potential "targets" for the modulation inflammation and some dietary agents were described as being promising "arrows" for inflammation targets. Dietary polyphenols with antioxidant and anti-inflammatory properties that act at the epigenetic level were also described. These include genistein, a flavonoid from soybeans that acts by inhibiting HDACs in renal and prostatic cancer cells. Sulphorophane from broccoli, has similar properties in prostatic cancer cell lines. Epigallocatechingallate (ECGG), a polyphenol from green tea, is a demethylating agent and can upregulate the expression of microRNA (mir)16, while curcumin derived from the dietary spice, turmeric, induces mir22, leading to inhibition of estrogen receptor (ESR)1 expression. Resveratrol, another natural product with anti-inflammatory properties, is an activator of SIRT1, another deactylating enzyme and leads to chromatin compaction and inhibition of the transcription of pro-inflammatory genes including TNF-α.

0006-2952/$ – see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bcp.2010.06.026

Several of these naturally occurring anti-inflammatory agents can also increase the efficacy of existing therapies. For example, radiotherapy for tumor treatment is associated with inherent resistance due to the over-expression of oncogenes, anti-apoptotic proteins or acquired resistance due to a transient activation of NF-κB. The latter can modulate apoptosis, tumor invasion and angiogenesis. In colorectal cancer, curcumin can increase the efficacy of radiation therapy by modulating cell proliferation, apoptosis and tumor invasion. Radiation also causes IκBα degradation and curcumin can inhibit this effect, leading to NF-κB activation and a reduction of pro-inflammatory cytokine release, e.g., TNFα, IL-1β, that is associated with fatigue.

In addition to the variety of natural compounds discussed, many synthetically derived small molecules were also reviewed as innovative approaches to target inflammation. 1,3-Cyclopentadiones are beneficial in chronic inflammation states as demonstrated in a mouse model of collagen-induced arthritis. Such molecules are pleiotropic and act via inhibiting NF-κB, NO production and the pro-inflammatory kinases Syk, BTK, GSK3β and PI3K. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors (e.g. ABT-888, olaparib) were also the subject of presentations. Inhibition of poly(ADP ribosylation) is important for DNA repair, replication and cell death and PARP activation is associated with NAD depletion leading to necrosis and inflammation. PARP can also activate AP1, MAPK and NF-κB which are required for pro-inflammatory cytokine expression. PARP inhibitors thus represent a novel approach to inhibit inflammation.

The finding that the cyclo-oxygenase COX-2 could be linked to leukemia was also a topic of debate. In contrast to literature data, COX-2 inhibitors were reported at the meeting to evoke a chemoresistant phenotype in the U937 cell line suggesting that the use of NSAIDs in combination with existing cancer therapies was not beneficial, making the discovery of other targets for treating inflammation being fundamental to finding improved treatments with reduced side effects.

Environmental factors evoking inflammation were also reviewed. In smokers, levels of the pro-inflammatory cytokine, IL-6 were markedly increased while MEHP derived from the plasticizer, DEHP (di(2-ethylhexyl) phthalate), increased ROS levels, an effect associated with the release of pro-inflammatory cytokines including TNFα.

In conclusion, inflammation remains a complex phenomenon involving many cell types and cellular pathways. In addition to mediating the acute inflammatory response, many aspects of a chronic inflammatory response can lead to cancer, osteoarthritis, diabetes and Alzheimer's disease and also neuropathic pain states. In addition to mediating the inhibition of the production of inflammatory mediators, some of the newer targets and some of those as yet to be discovered through which natural product mediators of inflammation may act, can lead to the down-regulation of pro-inflammatory gene expression which may represent a more facile approach to the treatment of disease states associated with chronic inflammation.

While inflammation has been a topic of study for many decades, there still remain many opportunities to identify improved targets to treat disease-associated inflammation. The meeting in Luxembourg aided significantly in identifying these and may thus be considered, along with this special issue of *Biochemical Pharmacology*, as a timely milestone for researchers advancing knowledge in the therapeutics of inflammation.

Acknowledgments

The Editors would like to thank "Recherches Scientifiques Luxembourg asbl" who organized the meeting. We thank the "City of Luxembourg", "Enzo" "Axxora", the "Fondation de Recherche Cancer et Sang", "Een Haerz fir kriibskrank Kanner asbl", "Kuwait Petroleum" and "Computer Home, Luxembourg" for additional support.

Finally all the organizers and participants are thanked for contributing to a very successful meeting.

Next meetings

Integrated cellular pathology – systems biology of human disease: January 26–29, 2011.

Natural compounds – regulators of cell signaling pathways and novel therapeutic tools: January 25–28, 2012.

Meeting information: http://www.transduction-meeting.lu

Cyril Sobolewski
Noémie Legrand
Franck Morceau
Marc Diederich*
Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg, 9 Rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

*Corresponding author. Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060
E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich)

Received 11 June 2010

Biochemical Pharmacology xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Editorial

Integrated cellular pathology—Systems biology of human diseases

Systems biology is an evolving field of multidisciplinary science that enables the characterization of the interactions between the various components of complex biological systems (e.g., cell cycle, proliferation, differentiation, death regulator, etc.) to provide the means to study cellular process in a holistic and integrated manner. This approach involves a variety of 'omics' disciplines including genomics, epigenomics, proteomics, metabolomics and signalomics that can be integrated using computational simulations to elaborate on mathematically predictive models of the molecular interaction networks occurring within the various systems.

The 9th international meeting in the field of signal transduction and gene expression, "Cell Signalomics 2011 – Integrated cellular pathology – Systems biology of human disease", took place January 26–29th at the New European Conference Center in Luxembourg. This meeting gathered 350 participants and outstanding speakers who shared their most recent findings. Fundamental mechanisms related to cell death, epigenetics, immunology, transcriptional control, proteomics and signaling networks involved in human disease states as well as translational applications were discussed during the meeting.

The interface between experimental biology and computational biology was highlighted as a means to enhance knowledge related to systems biology and the mechanisms of disease pathology. Systems biology approaches have already proved useful in diabetes, multiple types of cancer and AIDS. Nonetheless, experimental biology remains a key pillar in biomedical release and this was elegantly demonstrated in the keynote session. Indeed, the first presentation by Professor Mario Capecchi reinforced the critical role of animal models to study and understand the molecular and cellular mechanisms involved in human disease states. In providing examples of genetically modified mice, Professor Capecchi highlighted the link between gene mutations, neuropsychiatric disorders and behavioral phenotypes. As illustrated by the correlation between the *Hoxb*-8 gene mutation in mice and excessive and unrestrained grooming.

Several presentations focused on the process of cell death, specifically apoptosis and autophagy, and also highlighted aspects of cell differentiation. A common approach to initiate cancer cell death is the activation of apoptotic pathways, a process frequently altered in cancer cells. Advancements in knowledge in this field provide the means to identify new approaches to anticancer drug development such as targeting of the *Frizzled* pathway and CD95 signaling. Drug-induced apoptosis can, however, lead to severe side effects in cancer patients. One example, illustrated by Dr. Stefania Gonfloni, is the infertility resulting from apoptosis in oocytes, an effect observed after cisplatin-induced DNA damage. This was linked to an increase in *Abl* proto-oncogene expression by p63, which codes for the tyrosine kinase, *Bcr-Abl*. Imatinib, an inhibitor of *Bcr-Abl* is used for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). Imatinib can counteract cisplatin-induced oocyte apoptosis, which preserves fertility, suggesting its use as fertoprotective adjuvants for female patients treated with chemotherapeutics.

The control of apoptosis is also critical in AIDS. The presentation by Dr. Marie-Lise Gougeon concerned the ability of the HIV-1 retrovirus to subvert dendritic cell (DC) signaling pathways to promote viral replication and dissemination. The idea behind this study was that the DCs infected by HIV are resistant to TRAIL-induced apoptosis mediated by natural killer cells (NKs), an antiviral strategy developed by the immune system to rapidly eliminate infected DCs that act as HIV reservoirs. The high-mobility group box 1 (HMGB1) protein, located on NK–DC synapses, was identified as an essential effector of DC resistance to NK-dependent apoptosis. Indeed, HMGB1 is responsible for the up-regulation of the apoptosis inhibitors c-Flip and c-IAP2. Therefore, Dr. Marie-Lise Gougeon, as a strategy to eliminate viral persistence in DCs suggested targeting HMGB1. Other proteins related to the immune system are also important in apoptosis control. For example, SHIP-1 inhibits CD95-induced apoptosis in a T-cell leukemia cell type. Using a yeast two hybrid screening and hORFeome v5.1, a central resource of cloned human open reading frames (ORFs), Miss Claude Condé from Dr. Jacques Piette's Laboratory demonstrated that SHIP-1 interacts with the anti-apoptotic proteins, cIAP-1 and XIAP.

Inflammation plays a critical role in apoptosis and therefore in cancer. Cyclooxygenase-2 (COX-2), an enzyme induced by pro-inflammatory stimuli (e.g., TNFα, IL-1β), is responsible for the metabolism of arachidonic acid and leads to the production of prostaglandins. Pr. Young-Joon Surh showed that prostaglandin 15d-PGJ$_2$ has anti-inflammatory and cytoprotective activity by inhibiting NF-κB and redox-sensitive transcription factors as well as their regulators, AP-1, Nrf2-Keap1, STAT3 and p53. 15d-PGJ$_2$ can rescue cancer cells from peroxynitrite- and hydrogen peroxide-induced apoptosis by upregulating Nrf2. Moreover, Pr. Surh reported that 15d-PGJ$_2$ is also implicated in carcinogenesis by stimulating angiogenesis through the induction of vascular endothelium growth factor. Nowadays, according to the role of COX-2 in carcinogenesis, many COX-2 specific inhibitors as well as Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) have been developed to prevent tumor progression.

Autophagy is another form of cell death. It is a catabolic process characterized by the engulfment of intracellular components inside double membrane vesicles, autophagosomes. Induction of autophagy has been suggested as a novel strategy to treat diseases. However, recent data suggest that autophagy could be considered more as a survival pathway developed by cells to overcome environmental stressors like starvation or oxidation. Pr. Guido Kroemer reported that spermidine- and resveratrol-mediated

0006-2952/$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bcp.2011.05.032

prevention of acetylation of many autophagy related proteins can activate these and prolong life span in *C. elegans*. According to Dr. Eileen White, autophagy has also been implicated in cancer chemoresistance. Aggressive cancers bearing activating mutations in the proto-oncogene *Ras* have high basal levels of autophagy with the latter seemingly being required to maintain mitochondrial metabolism and tumorigenesis.

The correlation between the potential protective effects of autophagy and drug resistance in cancer cells was highlighted in studies by Pr. Anna Ivana Scovassi. The presentation demonstrated that 2-methoxyestradiol-induced apoptosis in HeLa, HCT116 and SW613-B3 cancer cell lines occurred concomitantly with the expression of autophagy-related markers. Similarly, the alkaloid berberine and its analogs also led to the expression of both apoptosis and autophagy markers in the same cells. These results should contribute to the understanding of the cross talk between autophagy and apoptosis in cancer cells.

The session related to epigenetic has been introduced by Dr. François Fuks who underlined the relevance of epigenetic in cancer. As it is known that cancers are associated with a global DNA methylation leading to silencing of tumor suppressor genes, understanding the pathways implicated in such mechanisms should bring novel strategies for cancer treatment. In this context, Dr. Fuks showed that the kinase CK2 can phosphorylate DNA methyltransferase 3a (DNMT3a), leading to an inhibition of its enzymatic activity and thus an inhibition of global DNA methylation. Phosphorylation also inhibits the nuclear translocation of DNMT3a. The second part of the presentation focused on the innovative infinium technology that allows the study of gene methylation. This method based on genome-wide DNA methylation array technology should permit to identify new cellular subgroups in cancer tissues. On the other hand, epigenetic events can affect cell differentiation. Pr. Gerry Melino showed that induction of miR-34a by a carboxy-terminal spliced variant of the tumor suppressor p73 (TAp73) during synaptogenesis leads to a decrease in the number of synapses via effects on synaptotagmin or syntaxin-1A.

Furthermore, the level of histone deacetylase (HDAC) is strongly increased in several cancers. Mr. Michael Bots from Pr. Ricky Johnstone's team, reported the beneficial effects of the HDAC inhibitors, vorinostat and panobinostat, in comparison to chemotherapy in a murin model. As an example, leukemic cells defective in p53, were resistant to chemotherapy but sensitive to HDAC inhibitors. Moreover, HDAC inhibitors treatment displayed less side effects compared to chemotherapy. Together, these findings underlined the importance of modulating epigenetic in treating cancer, as another alternative to chemotherapy. Valproic acid (VPA), the well-known anti-epileptic drug, is also an HDAC inhibitor and has potential anticancer properties. It can inhibit erythroid differentiation as described by Dr. Sébastien Chateauvieux. VPA down-regulated the expression of key transcription factors and erythroid specific genes (e.g., GATA-1, EPO-R, γ-globin) while increasing expression of PU-1, an inhibitor of erythroid differentiation. Conversely, PU-1 activation facilitated myeloid and lymphoid differentiation of hematopoietic stem-progenitor cells suggesting a potential side effect in VPA treatment of cancer patients.

A major challenge in cancer therapy is to develop newer approaches that specifically target cancer cells having minimal effects on normal cells. Dr. Evan T. Keller discussed the use of small RNA or DNA oligonucleotides and aptamers, as therapeutics for the treatment of cancer. Using SELEX (systemic evolution of ligands by exponential enrichment) an anti-invasive aptamer has been developed that can inhibit highly invasive prostate cancer and osteosarcoma cell lines *in vitro* as well as *in vivo*.

Studies focused on understanding neurodegenerative disease especially Alzheimer's disease (AD) represented an important part of the meeting. Amyloid-β plaques are thought to be associated with neuronal death in the cerebral cortex and the hippocampus, an effect that may involve the neurotrophin receptor (p75NTR). Pr. Xin-Fu Zhou showed that deletion of p75NTR in transgenic mice leads to a reduction of amyloid-β production together with an increase in the aggregation of these peptides suggesting that reducing p75NTR may exacerbate AD. As presented by Miss Sophie Losciuto from Pr. Paul Heuschling's laboratory, inflammation may also play a critical role in AD by enhancing neuronal death. Agonists of LXR, a nuclear receptor that can repress pro-inflammatory responses in microglia, down-regulate astrocyte activation via actions on microglia. Thus, indirect activation of astrocytes by LXR agonists can preserve neuronal viability.

The use of natural products for the treatment of AD was also discussed at the meeting. As shown by Miss Chan Lee, the flavone Luteolin, from *Perilla* leaves, can inhibit amyloid-β-mediated oxidative stress induced cell death. Pr. Vittorio Calabrese showed that dietary antioxidants, e.g., polyphenols and L-carnitine, are neuroprotective via the activation of hormetic effectors including vitagenes, a group of genes involved in preserving cellular homeostasis during stressful conditions.

The importance of computational biology in cancer research was underlined through The Cancer Genome Atlas (TCGA) project. Dr. Ilya Shmulevich presented data on integrated analyses of TCGA-derived high throughput experimental data sets that are designed to identify mechanisms for the regulation of gene expression, to differentiate the transcriptional profiles of different cancer cell types and to identify molecules that target members of the identified networks as potential starting points for therapeutics. Comparison of cancer-associated features of several cancer types is also feasible using the TCGA.

Understanding systems biology is fundamental in elucidating mechanisms of pathophysiology and in identifying novel therapeutic approaches to treat human disease states. The meeting in Luxembourg provided an excellent overview of the status of cutting-edge research in diseases like cancer, neurodegeneration and AIDS. As such diseases are multifactorial in their etiology, combination therapy seems an inevitable to address complex pathologies. Clarification of the mechanisms implicated in the side effects of existing therapies will be important in selecting the best targets and best compounds to treat patients.

Next meetings

Redox regulation – Natural compounds as regulators of inflammation signaling

(A RedCat – satellite meeting to Natural Compounds 2012) – January 24–26, 2012

Natural compounds 2012 – Regulators of cell signaling pathways and novel therapeutic tools – January 26–28, 2012

Under the patronage of Corena, a network aiming to create an internationally competitive cluster within the Greater Region (Saarland, Lorraine, Luxembourg, Wallonia, Rheinland-Pfalz). Corena is co-funded by European Regional development fund within the INTERREG IVA Greater Region program. The European Union invests in your future.

Meeting information: http://www.transduction-meeting.lu

Acknowledgements

We would like to thank "Recherches Scientifiques Luxembourg asbl" who organized the meeting. The Fonds National de la Recherche, Luxembourg, Kuwait Petroleum SA, The City of Luxembourg, The Fondation de Recherche "Cancer et Sang",

Computer Home and Canon are thanked for additional support. Finally all members of the organization team are thanked for their great organization.

Cyril Sobolewski
Elodie Viry
Noémie Legrand
Florian Muller
Franck Morceau
Marc Diederich*

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg, 9 Rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

*Corresponding author. Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060
E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

Résumé

Les cyclooxygénases (COXs) sont une famille d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des prostaglandines. COX-2 est la forme inductible qui est induite pendant l'inflammation et qui est surexprimée dans plusieurs cancers. Plusieurs évidences suggèrent que COX-2 joue un rôle dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. Ces évidences concernent surtout les tumeurs solides et les mécanismes impliqués ne sont pas complètement connus et surtout pour les cancers d'origine hématopoïétique. Pour notre étude, nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs de COX-2 (nimésulide, NS-398 et célécoxib) sur la prolifération et l'apoptose de lignées cellulaires leucémiques et lymphoblastiques, Hel, Jurkat, Raji et U937.

Nous avons montré que les différents inhibiteurs de COX-2 diminuent la prolifération des différentes lignées cellulaires. Les cellules U937 sont apparues comme les cellules les plus sensibles à ces inhibiteurs alors que les cellules K562 étaient les plus résistantes. Nous avons montré que cette modulation correspond à une accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, accompagnée d'une diminution précoce de l'expression de c-Myc et d'une augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation dans les cellules U937 (CD15) et Hel (CD41a et CD61).

Dans la deuxième partie de ce projet, nous avons étudié les effets des différents inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose induite par différents agents chimiothérapeutiques dans nos modèles cellulaires. Nous avons ainsi montré que les inhibiteurs de COX-2 inhibent fortement l'apoptose induite par plusieurs agents chimiothérapeutiques. Nous avons démontré que la prévention de l'apoptose se situe avant l'activation de Bax et de Bak. Par ailleurs, cet effet est caractérisé par une incapacité des agents chimiothérapeutiques à déclencher un stress apoptotique. Toutes nos données ont donc démontré un effet anti-apoptotique des inhibiteurs de COX-2 sur l'apoptose intrinsèque *vs* l'apoptose extrinsèque à un stade précoce de l'induction de l'apoptose. Ces données suggèrent des précautions quant à l'utilisation des inhibiteurs de COX-2 en combinaison avec la chimiothérapie.

Dans la troisième partie de notre projet, nous avons étudié la combinaison des inhibiteurs de COX-2 avec la curcumine, une substance naturelle connue pour ses propriétés antitumorales. Nos travaux ont montré que la curcumine seule conduit à une accumulation des cellules U937 en phase G2/M du cycle cellulaire, suivie d'une induction d'apoptose. Cependant, le prétraitement des cellules U937 avec du célécoxib à des concentrations non-apoptogéniques contrecarre l'apoptose induite par la curcumine, suggérant ainsi que ce type de combinaison ne serait pas une bonne stratégie dans les cellules hématopoïétiques.

L'utilisation chronique des inhibiteurs de COX-2 peut être associée à des effets secondaires importants consécutifs à l'inhibition de l'activité de COX-2. Dans la dernière partie de notre projet, nous avons démontré que le 2,5 diméthyl-célécoxib (DMC), un analogue du célécoxib qui n'inhibe pas l'activité de COX-2, induit une diminution de la prolifération cellulaire et induit l'apoptose des cellules U937 et K562. Par ailleurs, ces effets sont plus importants que ceux observés avec le célécoxib. Par conséquent, ce composé a démontré de meilleures propriétés antitumorales et représente une voie thérapeutique prometteuse contre les leucémies

Tous nos résultats soutiennent donc l'idée que les inhibiteurs de COX-2 présentent les effets anti-tumoraux les plus efficaces que lorsqu'ils sont administrés seuls. Les effets observés avec le DMC suggèrent que ce composé pourrait représenté une voie alternative aux inhibiteurs de COX-2 en thérapie anti-cancéreuse.

Mots-clefs : COX-2, leucémie, inflammation, apoptose, cycle cellulaire, c-Myc.

Abstract

Cyclooxygenases (COXs) are a family of enzymes, which catalyze the rate-limiting step in prostaglandin biosynthesis. COX-2 is the inducible isoform, upregulated during inflammation and overexpressed in various cancers. There are evidences of a role for COX-2 in cell proliferation and apoptosis especially in solid tumors, whereas little is known for cancers of hematopoietic origin. In our study, we analyzed the effect of COX-2 inhibitors (nimesulide, NS-398 and celecoxib) on cell proliferation and apoptosis of a panel of leukemic and lymphoblastic cell lines, Hel, Jurkat, K562, K562, Raji and U937.

We found that the different inhibitors slow down cell proliferation in the different hematologic cell lines tested. U937 cells appeared as the most sensitive, whereas K562 were the most resistant to this effect. We provide evidence that this modulation corresponds to an accumulation of the cells in G0/G1 paralleled by an early downregulation of c-Myc and the expression of cell type-specific differentiation markers in U937 (CD15) and Hel (CD41a and CD61).

In the second part of our study, we investigate the effect of COX-2 inhibitors on apoptosis induced by chemotherapeutic agents in our cell models. We demonstrated that COX-2 inhibitors strongly prevent apoptosis induced by a panel of chemotherapeutic agents. We demonstrated an early prevention of apoptotic signaling, prior to Bax/Bak activation. The preventive effect is associated with an impairment of the ability of chemotherapeutic agents to trigger their apoptogenic stress. Altogether, our results demonstrate an anti-apoptotic effect of COX-2 inhibitors on intrinsic *vs.* extrinsic apoptosis at early steps of apoptosis commitment. These results suggest cautions in the use of COX-2 inhibitors with chemotherapy.

In the third part of our project, we investigated the combination of COX-2 inhibitors with curcumin, a natural product known for its anti-tumor properties. Our findings show that curcumin alone leads to an accumulation of U937 cells in G2/M phase of cell cycle, followed by an induction of apoptosis. However, the pretreatment of U937 cells with celecoxib at non-apoptogenic concentrations, counteracted curcumin-induced apoptosis, thus showing that this combination is not a good anti-cancer strategy in our cell models.

The chronic use of COX-2 inhibitors can be associated with severe side effects due to the inhibition of COX-2 enzyme. In the last part of our project, we demonstrated that 2,5 dimethyl-celecoxib (DMC), a structurally analogue of celecoxib, which is not able to inhibit COX-2 activity, induces an inhibition of cell proliferation and an induction of apoptosis in U937 and K562 cells. These effects are stronger than those observed with celecoxib. Thus, this compound demonstrated better anti-tumor properties and may represent a promising therapeutic approach against leukemia.

Altogether, our study supports the idea that COX-2 inhibitors display anti-tumor effects in our cell models, but only when administrated alone. The effects observed with DMC suggest that this compound may represent an alternative approach to COX-2 inhibitors in cancer therapy.

Key words: COX-2, leukemia, inflammation, apoptosis, cell cycle, and c-Myc.