



HAL
open science

Conséquences articulaires de la sélectivité d'inhibition des COXs par les AINS dans des modèles expérimentaux d'arthropathie

Christelle Boileau

► **To cite this version:**

Christelle Boileau. Conséquences articulaires de la sélectivité d'inhibition des COXs par les AINS dans des modèles expérimentaux d'arthropathie. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT : 2002NAN12502 . tel-01748130

HAL Id: tel-01748130

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748130v1>

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.



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>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ-NANCY I

2002

ECOLE DOCTORALE " BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT "

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 mars 2002

DS 86147

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ-NANCY I

Mention "Sciences du Médicament"

Par

Christelle BOILEAU

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Métabolisme et Mécanisme d'Action des Médicaments
Pharmacologie Clinique

Sujet :

***Conséquences articulaires de la sélectivité d'inhibition
des COXs par les AINS
dans des modèles expérimentaux d'arthropathie***

MEMBRES DU JURY

Juges :	P NETTER	Professeur
	J-Y JOUZEAU	Docteur
	P GILLET	Professeur
	J MARTEL-PELLETIER	Professeur
Rapporteurs :	F BERENBAUM	Professeur
	W HORNEBECK	Professeur



Je remercie Monsieur le Professeur Patricie Netter pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Pierre Pelletier et Madame la Professeure Johanne Martel-Pelletier pour leur accueil dans leur unité de recherche et pour avoir rendu possible la réalisation d'une partie de ce travail. Qu'ils soient assurés de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Yves Jouzeau pour avoir initié et mené à bien ce projet. Je le remercie de m'avoir fait partager ses connaissances méthodologiques et pharmacologiques. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur Francis Berenbaum pour m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur William Hornebeck pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur Pierre Gillet pour m'avoir fait bénéficier de son enthousiasme et de ses connaissances médicales.

Je remercie Mademoiselle le Docteur Emmanuelle Nédélec et Mademoiselle le Docteur Séverine Leclerc pour leur disponibilité, leur soutien et leurs conseils.

Je remercie Madame Meriem Koufany et Mademoiselle Stéphanie Etienne pour leur aide technique précieuse et leur soutien.

Je remercie Monsieur Michel Thiery pour ses bons soins aux animaux.

Je remercie l'ensemble du personnel du Laboratoire de Pharmacologie (Nancy, France) et de l'Unité de Recherche en Arthrose (Montréal, Canada).

Je remercie mes amis qui ont fait de ces années des moments inoubliables.

A mes parents,

A ma sœur, Emmanuelle,

A mes grands-parents,

A Patrick et Marie, Alex et Matthieu,

A François, Brigitte et Ludovic

A Arturo,

A ceux qui m'ont apporté affection et soutien,

je dédie cette thèse...

Publications

Boileau C, Martel-Pelletier J, Jouzeau JY, Netter P, Moldovan F, Laufer S, Tries S, Pelletier JP. ML-3000, a dual inhibitor of both 5-lipoxygenase and cyclooxygenase, reduces the level of cartilage chondrocyte death in vivo in experimental dog osteoarthritis: inhibition of proapoptotic factors. *Journal of Rheumatology* (sous presse)

Boileau C, Blain H, Nedelec E, Llieu PL, Koufany M, Terlain B, Gillet P, Netter P, Pairet M, Jouzeau JY. Biotelemetric assessment of Meloxicam's efficacy in adjuvant arthritis with special care to tissular cyclooxygenase inhibition and cartilage anabolism. *Journal of Rheumatology* (en préparation)

Boileau C, Martel-Pelletier J, Moldovan F, Jouzeau JY, Netter P, Manning P, Pelletier JP. The in situ upregulation of chondrocyte interleukin-1 converting enzyme (ICE) and IL-18 levels in experimental osteoarthritis is mediated by nitric oxide. *Arthritis and Rheumatism*, (sous presse).

Blain H, **Boileau C**, Lopicque F, Nédélec E, Loeuille D, Guillaume C, Gaucher A, Jeandel C, Netter P, Jouzeau JY. Pitfalls in the in vitro whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2001 (sous presse)

Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique
aa : acide aminé
ACF : Adjuvant Complet de Freund
AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
Arg: Arginine
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
CE : Concentration Efficace
CI : Concentration Inhibitrice
CU : Concentration Ulcérogène
COX : Cyclooxygénase
CXB : Célécoxib
DE : Dose Efficace
DI : Dose Inhibitrice
DU : Dose Ulcérogène
EGF : *Epidermal Growth Factor* ou facteur de croissance épidermique
FLAP : *Five Lipoxygenase Activating Protein* ou protéine activatrice de la 5-lipoxygénase
GAGs : GlycosAmino Glycanes sulfatés
GI : GastroIntestinal
Gly : Glycine
HETE : Hydroxyéicosatétraénoïque
HPETE : Hydroxyperoxyéicosatétraénoïque
IL-1 : Interleukine-1
Kéto : Kétoprofène
LCA : Ligament Croisé Antérieur
Leu : Leucine
LOX : Lipoxygénase
LPS : Lipopolysaccharides
LT : Leucotriène
MIA : MonoIodoAcétate
MLX : Méloxicam
MMP : *Matrix MetalloProteinases* ou métalloprotéases matricielles
Mor : Morphine
NO : Monoxyde d'Azote
NOS : NO Synthase
iNOS : NO Synthase inductible
NPX : Naproxène
OA : Arthrose
ORF: *Open Reading Frame* ou phase ouverte de lecture
PDGF: *Platelet Derived Growth Factor* ou facteur de croissance dérivé des plaquettes
PG : Prostaglandine
PGD₂ : Prostaglandine D₂
PGDS : PGD Synthase
PGE₂ : Prostaglandine E₂
PGES : PGE Synthase
 mPGES : PGE Synthase membranaire
 cPGES : PGE Synthase cytosolique
PGF_{2α} : Prostaglandine F_{2α}
PGH₂ : Prostaglandine H₂
PGI₂ : Prostaglandine I₂ ou Prostacycline

PGIS : PGI Synthase
PGHS : Prostaglandin Endoperoxide H Synthase
PGS : Prostaglandine Synthase
PLA₂ : Phospholipase A₂
 cPLA₂ : Phospholipase A₂ cytosolique
 sPLA₂ : Phospholipase A₂ sécrétoires
PPAR : Récepteur des Activateurs de Proliférateur de Péroxyosome
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
Ser : Sérine
RE : Réticulum Endoplasmique
RFX : Rofécoxib
TNF α : *Tumor Necrosis Factor α* ou facteur de nécrose tumorale
Trp : Tryptophane
Tx : Thromboxane
TXS: Thromboxane Synthase
Tyr : Tyrosine
UTR : *Untranslated Region* ou région non-traduite
Val : Valine



Table des matières



ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	14
I. ISOENZYMES DE LA CYCLOOXYGENASE	15
I.1. Généralités	15
I.1.1. Protéines	15
I.1.1.a. Site actif	19
I.1.1.b. Régions N et C-terminales.....	20
I.1.2. Gènes	24
I.1.2.a. Structure des gènes	24
I.1.2.b. Régulation.....	24
I.2. Localisation cellulaire.....	28
I.3. Activité catalytique.....	28
I.3.1. Régulation de l'activité enzymatique	29
I.3.2. Interaction avec le substrat	31
I.3.2. Rôle du monoxyde d'azote (NO).....	33
I.4. Fonction : de la synthèse des PGs aux rôles physiopathologiques des COXs.....	34
I.4.1. Les prostaglandines	35
I.4.1.a. Nomenclature.....	35
I.4.1.b. Les endoperoxydes	36
I.4.1.c. Les prostaglandines primaires.....	37
I.4.1.d. Les thromboxanes.....	37
I.4.1.e. La prostacycline et ses dérivés.....	37
I.4.2. Phospholipase A ₂ (PLA ₂) et prostaglandines synthases (PGS)	39
I.4.3. Les récepteurs des prostaglandines.....	42
I.4.3.a. Les récepteurs membranaires.....	43
I.4.3.b. Les récepteurs nucléaires.....	44
I.4.4. Conséquences physiopathologiques de l'existence des deux isoformes de COX ..	45
I.4.4.a. Système cardiovasculaire.....	47
I.4.4.b. Hémostase.....	47
I.4.4.c. Système respiratoire.....	48
I.4.4.d. Fonction rénale	48
I.4.4.e. Système reproducteur.....	49
I.4.4.f. Tube digestif.....	49
I.4.4.g. Inflammation.....	50
I.4.4.h. Effet sur le cartilage.....	54
I.4.4.i. Mort cellulaire programmée ou apoptose.....	56
I.4.4.j. Cancer.....	58
I.4.4.k. COX et os	60
I.5. Voie de la lipoxigénase.....	61
I.5.1. Les leucotriènes	61
I.5.2. Les lipoxigénases (LOX).....	62
I.6. L'hypothèse d'existence d'une 3 ^{ème} isoforme de la COX	63
II. Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)	66
II.1. Mode d'action des AINS	66
II.2. Classification des AINS classiques	67
II.3. Base de la sélectivité des AINS.....	68

II.3.1. L'hypothèse COX-2	69
II.3.2. Mise en évidence de la sélectivité in vitro	73
II.4. Les inhibiteurs préférentiels de COX-2.....	74
II.5. Les inhibiteurs sélectifs de COX-2	75
II.5.1. Les éthers diaryl- et aryl-hétéroaryles.....	76
II.5.2. Les hétérocycles diaryles.....	76
II.5.2.a. Célécoxib (Celebrex®).....	77
II.5.2.b. Rofécoxib (Vioxx®).....	80
II.5.2.c. Etoricoxib	82
II.6. Effets des AINS.....	83
II.6.1. Effets gastro-intestinaux.....	83
II.6.1.a. Mécanisme.....	84
II.6.1.b. Effets des inhibiteurs sélectifs de COX-2	85
II.6.1.c. Effets gastro-intestinaux différents des ulcères	86
II.6.2. Système cardio-vasculaire.....	86
II.6.3. Effet sur la fonction rénale.....	87
II.6.4. Cancer.....	88
II.6.5. Cartilage	89
II.6.6. Apoptose.....	90
II.7. Alternative au traitement par les inhibiteurs sélectifs de COX-2.....	91
II.7.1. Inhibiteur mixte COX/LOX	92
II.7.2. Paracétamol	95
II.7.3. Modification des AINS classiques	96

OBJECTIF DU TRAVAIL 97

ETUDE EXPERIMENTALE-1ERE PARTIE..... 101

**MISE EN EVIDENCE DE LA SELECTIVITE D'INHIBITION DES COXS IN VIVO-
ETUDE DU MELOXICAM..... 101**

I. MATERIEL ET METHODE 102

I. Animaux et traitements.....	102
I.1. Animalerie	102
I.2. Induction de l'arthrite.....	102
I.3. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS).....	102
II. Evaluation de la sévérité de la réaction inflammatoire	102
II. 1. Biotéléométrie	102
II. 2. Autres paramètres.....	103
IV. Etude de la biosynthèse des protéoglycanes du cartilage patellaire	104
V. Evaluation de la production des eicosanoïdes par les cellules sanguines	105
VI. Etude de la production des prostaglandines dans les pattes inflammatoires	106
VII. Etude du contenu gastrique en prostaglandines.....	106
VIII. Dosage sérique de l'interleukine-6.....	106
IX. Analyse statistique	107

RESULTATS..... 108

I. Comparaison des effets anti-inflammatoires des molécules.....	108
I.1. Evolution de la masse pondérale et du score clinique	108
I.2. Effet anti-œdémateux.....	109

I.3. Réduction du handicap fonctionnel	110
I.4. Réduction des marqueurs biologiques de la réaction inflammatoire.....	111
II. Propriétés anti-pyrétiques des molécules	112
III. Répercussion des processus dysimmunitaires sur les organes lymphoïdes	113
IV. Comparaison de la sélectivité d'inhibition des molécules <i>in vivo</i>	114
IV.1. Production sérique de TxB ₂ par les plaquettes.....	114
IV.2. Production plasmatique de PGE ₂ par les leucocytes activés.....	115
IV.3. Pouvoir inhibiteur des AINS dans les tissus cibles.....	116
IV.3.1. Inhibition de la synthèse des PGE ₂ dans les pattes inflammatoires.....	116
IV.3.2. Inhibition de la synthèse des PGE ₂ dans la muqueuse gastrique.....	116
IV.3.3. Index de sélectivité	117
V. Effet des molécules sur l'anabolisme du cartilage patellaire	118
VI. Tableau récapitulatif.....	120

ETUDE EXPERIMENTALE-2EME PARTIE 121

EFFET D'UN INHIBITEUR SELECTIF DE COX-2, CELECOXIB, SUR LE CARTILAGE ARTICULAIRE DANS DIFFERENTS MODELES D'ARTHRITE..... 121

I. Effet du célécoxib sur la fonction articulaire et le cartilage patellaire dans le modèle expérimental d'arthrite aiguë au zymosan chez le rat..... 122

I.1. MATERIEL ET METHODE.....	122
I.1.1. Animaux et traitement	122
I.1.1.a. Animalerie.....	122
I.1.1.b. Induction de l'arthrite et traitements.....	122
I.1.2. Paramètres étudiés	122
I.1.2.a. Température corporelle et activité locomotrice.....	122
I.1.2.b. Mesure du diamètre des genoux	122
I.1.2.c. Anabolisme des protéoglycanes.....	123
I.1.2.d. Dosage de l'interleukine-6 circulante.....	123
I.1.3. Analyse statistique	123
I.2. RESULTATS.....	124
I.2.1. Effet anti-œdémateux.....	124
I.2.2. Réduction du handicap fonctionnel	124
I.2.2.1. Demi-dose avant l'induction de l'arthrite.....	124
I.2.2.2. Pleine dose avant l'induction de l'arthrite.....	125
I.2.3. Taux d'IL-6 circulante.....	126
I.2.4. Propriétés anti-pyrétiques des molécules.....	127
I.2.4.1. Demi-dose avant l'induction de l'arthrite.....	127
I.2.4.2. Pleine dose avant l'induction.....	128
I.2.5. Anabolisme des protéoglycanes du cartilage.....	129
I.3. ANALYSE GLOBALE	131

II. Effet du célécoxib sur la fonction articulaire et le cartilage patellaire dans le modèle expérimental de polyarthrite (arthrite à l'adjuvant) chez le rat 132

II.1. MATERIEL ET METHODE	132
II.1.1. Animaux et traitements	132
II.1.1.1. Animalerie.....	132
II.1.1.2. Induction de l'arthrite et traitements	132
II.1.2. Evaluation de la sévérité de l'arthrite.....	132

II.1.2.1. Température corporelle et activité locomotrice.....	132
II.1.2.2. Paramètres classiques d'évaluation de la sévérité de l'arthrite.....	132
II.1.2.4. Mesure de l'IL-6 circulante.....	132
II.1.3. Anabolisme des protéoglycanes.....	132
II.1.4. Contenu en médiateurs dans les tissus cibles.....	132
II.1.4.1. Contenu en PGE ₂ dans les pattes arthritiques.....	133
II.1.4.1. Contenu en PGE ₂ dans la muqueuse gastrique.....	133
II.1.4.3. Taux circulant de TxB ₂	133
II.1.5. Analyse statistique.....	133
II.2. RESULTATS.....	134
II.2.1. Comparaison des effets anti-inflammatoires des molécules.....	134
II.2.1.1. Evolution de la masse pondérale et du score clinique.....	134
II.2.1.2. Effet anti-œdémateux.....	135
II.2.1.3. Réduction du handicap fonctionnel.....	137
II.2.1.3. Diminution des marqueurs biologiques de l'inflammation.....	139
II.2.2. Propriétés anti-pyrétiques des molécules.....	139
II.2.3. Sélectivité d'inhibition des COXs in vivo.....	141
II.2.3.1. Inhibition de la COX plaquettaire par les AINS au cours de la polyarthrite à l'adjuvant.....	141
II.2.3.2. Pouvoir inhibiteur des AINS dans les tissus cibles au cours de l'arthrite à l'adjuvant.....	142
II.2.4. Anabolisme des protéoglycanes du cartilage.....	143
Discussion de la 1^{ère} et de la 2^{ème} parties.....	146

ETUDE EXPERIMENTALE-3EME PARTIE..... 152

EFFET D'UN INHIBITEUR SELECTIF DE COX-2, ROFECOXIB, SUR L'APOPTOSE CHONDROCYTAIRE DANS L'ARTHROSE EXPERIMENTALE AU MIA CHEZ LE RAT..... 152

MATERIEL ET METHODE.....	153
I. Animaux et traitements.....	153
I.1. Animalerie.....	153
I.2. Induction de l'arthrose.....	153
I.3. Traitements.....	153
II. Etude de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage patellaire.....	153
III. Etude histologique.....	154
III.1. Préparation des spécimens.....	154
III.2. Colorations histologiques.....	154
III.2.1. Bleu de toluidine.....	154
III.2.2. Hématoxyline-Eosine-Safran (HES).....	154
III.2.3. Score histologique de sévérité.....	155
IV. Etude de l'effet de l'inhibition sélective de COX-2 sur l'apoptose chondrocytaire....	156
IV.1. Détection de l'apoptose in situ.....	156
IV.2. Immunodétection de la caspase-3 active, de la COX-2 et de la iNOS dans le cartilage articulaire.....	157
IV.3. Analyse morphométrique.....	158
VI.4. Analyse statistique.....	158

Résultats	159
I. Anabolisme des protéoglycanes du cartilage patellaire.....	159
II. Evaluation histologique de la sévérité de l'atteinte articulaire au cours de l'arthrose au MIA.....	160
IV. Immunodétection d'un effecteur de l'apoptose dans le cartilage articulaire : la caspase-3 active.....	165
V. Immunodétection des médiateurs potentiels de l'apoptose.....	166
V.1. iNOS.....	166
V.2. COX-2.....	167
ETUDE EXPERIMENTALE-4EME PARTIE	172
EFFET D'UN INHIBITEUR MIXTE COX/5-LOX, ML-3000, SUR L'APOPTOSE CHONDROCYTAIRE DANS L'ARTHROSE EXPERIMENTALE PAR LCA CHEZ LE CHIEN	172
MATERIEL ET METHODE	173
I. Animaux et traitements.....	173
I.1. Animaux	173
I.2. Induction de l'arthrose.....	173
I.3. Traitements	173
II. Etude de l'effet de l'inhibition mixte COX/5-LOX sur l'apoptose chondrocytaire.....	173
II.1. Préparation des spécimens.....	173
II.2. Détection de l'apoptose in situ	174
III. Etudes immunohistochimiques	175
IV. Analyse morphométrique.....	175
V. Analyse statistique	176
RESULTATS	177
I. Apoptose chondrocytaire.....	177
II. Détection d'un effecteur de l'apoptose par immunohistochimie : la caspase-3 active ..	177
III. Détection des médiateurs potentiels de l'apoptose par immunohistochimie	179
III.1. iNOS.....	179
III.2. COX-2.....	179
Discussion de la 3^{ème} et de la 4^{ème} parties	184
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	195
ANNEXES	237



Etude bibliographique

I. ISOENZYMES DE LA CYCLOOXYGENASE

I.1. Généralités

I.1.1. Protéines

Les cyclooxygénases (COXs) ou prostaglandine endoperoxyde H synthases (PGHS) (EC 1.14.99.1) sont des enzymes clés de la voie de biotransformation de l'acide arachidonique (AA). Elles catalysent la première étape de biosynthèse des prostaglandines (PG) en assurant la conversion de l'AA en prostaglandine H₂ (PGH₂).

Les COXs existent sous deux isoformes au moins (Vane et Botting, 1996). La première, COX-1, est une enzyme exprimée de façon constitutive. Elle tient un rôle important dans de nombreux processus physiologiques notamment la cytoprotection de la muqueuse digestive et la régulation de l'hémodynamique rénale. COX-2, isoforme identifiée plus récemment (Xie et coll, 1991) est inductible expérimentalement sous l'effet d'une stimulation par certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF α), des facteurs de croissance (PDGF, EGF), des esters de phorbol (*in vitro*) ou encore par le lipopolysaccharide (LPS) (Kujubu et coll, 1991 ; Sirois et coll, 1992). Elle est exprimée au cours de différents processus tels que l'inflammation, l'ovulation et certains processus mitogènes. L'existence d'une seconde isoforme de COX a été suspectée quand l'induction de l'expression d'une protéine après stimulation par des cytokines a été mise en évidence (Raz et coll, 1989) et l'augmentation de la synthèse des PGs sous l'effet du LPS dans les monocytes humains (Fu et coll, 1990) puis dans des macrophages péritonéaux de souris *in vivo* (Masferrer et coll, 1990). Cette augmentation est inhibée par la dexaméthasone et associée à la synthèse *de novo* d'une nouvelle protéine de COX. COX-2 a alors été identifiée comme une isoforme distincte, codée par un gène différent de celui de la COX-1 (Xie et coll, 1991 ; Xie et coll, 1992 et 1993 ; O'Banion et coll, 1991 ; Kujubu et coll, 1991 ; Sirois et coll, 1992).

Les deux isoformes de COX ont des structures quaternaires identiques, mais elles diffèrent dans la stabilité de leurs structures secondaire et tertiaire. La structure de COX-2 est globalement moins stable que celle de COX-1, notamment au niveau des sites actifs cyclooxygénasique et peroxydasique (Xiao et coll, 1998). Ceci pourrait expliquer les différences existant entre les 2 isoformes pour les interactions avec les substrats, les activateurs ou les inhibiteurs.

Les propriétés enzymatiques des deux isoformes de COX sont également proches : elles présentent un K_m identique pour l'AA (3,0 μ M pour COX-1 et 2,5 μ M pour COX-2) ainsi que des V_{max} similaires (Meade et coll, 1993). Néanmoins, elles diffèrent par certaines propriétés dont la localisation chromosomique et la régulation de leurs gènes, la taille de leurs messagers (4 kb pour COX-2 et 2,8 kb pour COX-1) ou encore leur expression tissulaire (Tableau 1).

Après des régulations post-transcriptionnelles dans le réticulum endoplasmique (RE), les formes matures de COX-1 et -2 ont une masse moléculaire apparente de 67-72 kDa. Trois structures cristallographiques ont été publiées, la COX-1 ovine (Picot et coll, 1994 ; Garavito, 1994), la COX-2 recombinante humaine (Luong et coll, 1996) et la COX-2 recombinante murine (Kurumbail et coll, 1996) (Figure 1 et Figure 2). Les structures cristallographiques ont

permis de montrer que les enzymes de la COX sont des homodimères glycosylés, solubles dans les détergents. Chaque monomère est formé de trois sous-unités (Figure 1 et Figure 4): i) un domaine N-terminal « EGF-like » impliqué dans la liaison des monomères (du résidu 34 au résidu 72); ii) un domaine de liaison à la membrane constitué de quatre hélices amphipatiques, dont trois coplanaires, disposées en spirale (du résidu 73 au résidu 116) (Figure 3); et iii) un domaine catalytique définissant un long canal hydrophobe au sein de la protéine globulaire (du résidu 117 au résidu 160) (Garavito, 1996 ; Loll et coll, 1996).

Les deux isoformes ont des caractéristiques structurales voisines. Elles partagent en effet, entre 60 et 65 % d'homologie au niveau de leurs séquences en acides aminés (aa) au sein d'une même espèce et entre les espèces. Leurs structures tertiaire et quaternaire sont par conséquent très similaires (Luong et coll, 1996 ; Kurumbail et coll, 1996). La structure tertiaire du domaine catalytique présente des homologies avec les autres peroxydases de mammifère (Picot et coll, 1994 ; Garavito, 1994), ce qui suggère que les COXs dérivent d'une forme ancestrale de peroxydase soluble qui aurait acquis la capacité à se lier à la membrane (Garavito et coll, 1994 ; Picot et coll, 1994). Cette hypothèse a récemment été testée par DeWitt et coll (Li et coll, 1998). L'utilisation de constructions chimères contenant le domaine EGF-like et le domaine de liaison à la membrane a également suggéré que ces deux domaines agissent comme un seul et unique motif pour créer une protéine membranaire à partir d'un précurseur soluble. Ainsi les isoenzymes de la COX interagiraient avec la membrane du RE par l'intermédiaire de la pénétration du domaine de liaison à la membrane de l'enzyme dans le premier feuillet de la membrane pour devenir des protéines membranaires monotopiques.

Les mécanismes permettant la maturation, les régulations post-transcriptionnelles, la localisation et l'adressage des isoenzymes de la COX ne sont pas encore tous élucidés. Cependant, les structures cristallographiques des deux isoformes devraient permettre de réaliser les expériences nécessaires à l'explication du mécanisme d'insertion dans la membrane et d'adressage des protéines (Garavito et DeWitt, 1999).

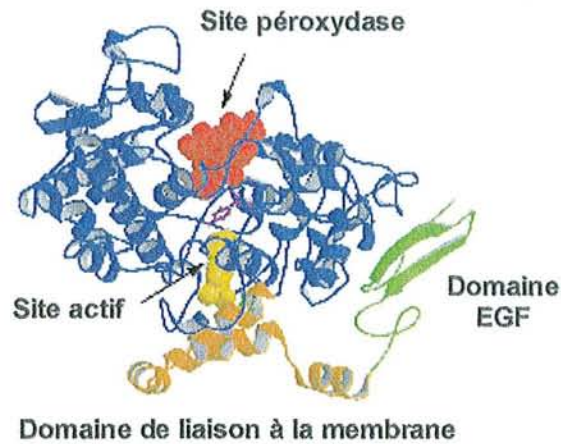


Figure 1 Structure en ruban d'un monomère de COX-1 ovine, vu depuis l'interface du dimère. Le groupement hème est représenté en rouge, le site de fixation du flurbiprofène (dit actif) est représenté en jaune. Les domaines EGF-like, de liaison à la membrane et le domaine catalytique sont représentés respectivement en vert, orange et bleu. Plusieurs unités saccharidiques sont schématisées au niveau des sites de glycosylation (d'après Garavito et DeWitt, 1999).

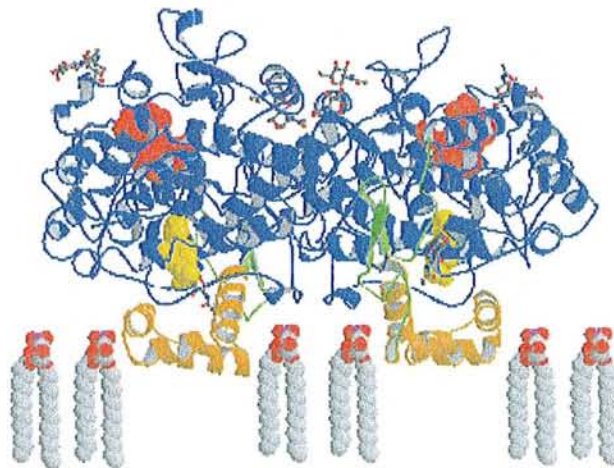


Figure 2 Structure en ruban d'un dimère de COX-1 ovine montrant la relation entre le groupement hème (rouge), le site de fixation du flurbiprofène (jaune) et la position dans le feuillet interne de la bicouche du RE (d'après Garavito et DeWitt, 1999).

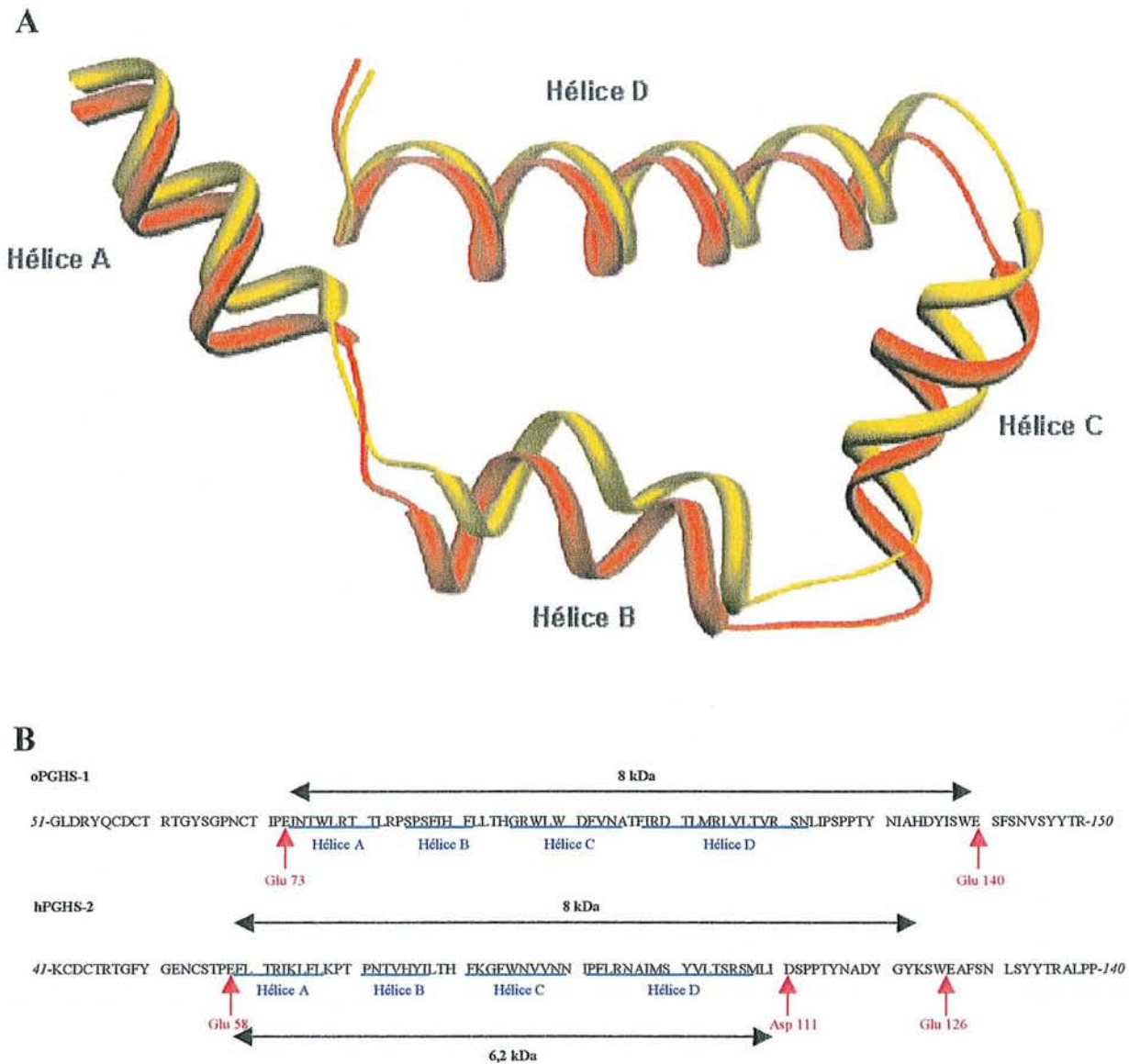


Figure 3 A : Structure en ruban des hélices A, B, C et D du domaine de liaison à la membrane de la COX (d'après Smith et coll, 2000); **B :** Séquences en aa des domaines de liaisons à la membrane de COX-1 ovine et de COX-2 humaine (d'après Spencer et coll, 1999).

1.1.1.a. Site actif

Il est important de noter l'existence de différences subtiles au niveau du site catalytique des deux isoformes.

Le site catalytique est un long canal hydrophobe dans lequel s'engage le substrat pour y être transformé. L'entrée du canal est aménagée par les hélices du domaine membranaire (Figure 3) (Garavito, 1996). Les sites actifs cyclooxygénasique et peroxydasique sont adjacents mais distincts, le site peroxydasique se situant au dessus et n'ayant aucune continuité avec le site cyclooxygénasique. La résolution de la structure cristallographique de COX-1 (Picot et coll, 1994) a permis de confirmer qu'un certain nombre d'aa jouent un rôle important. Ainsi, la tyrosine en position 385 (Tyr385) (à proximité de l'apex du canal hydrophobe) est indispensable à l'activité cyclooxygénasique. L'arginine en position 120 (Arg120) permet, quant à elle, la fixation de l'AA ou d'un AINS par leur fonction acide carboxylique. Certaines molécules de type « apirine-like », comme le flurbiprofène, inhibent COX-1 en éliminant l'arachidonate de la partie supérieure du canal. La Tyr385 et la Ser530 (ovine ou 529 humaine) se situent à l'apex de ce long canal. L'aspirine inhibe de façon irréversible la COX en acétylant la Ser530, empêchant ainsi l'accès de l'AA au site actif de l'enzyme. Le stéréoisomère S(-) du flurbiprofène interagit via sa fonction carboxylique avec l'Arg120, plaçant un second cycle phényl en contact avec la Tyr385. Cependant, il peut exister de nombreux autres sites permettant aux drogues de se fixer dans ce canal. Il existe d'ailleurs plusieurs aa identiques dans les deux isoformes de COX comme l'Arg106, la Ser516 ou la Tyr371 (Figure 5). En revanche, dans le site actif de COX-2, une Val509 remplace l'Ile523 dans COX-1 (Mancini et coll, 1995). Ce changement permet d'augmenter le volume accessible autour de la Tyr371, et malgré les 89 % d'homologies entre les sites actifs des deux enzymes, COX-2 a un canal hydrophobe 25 % plus large que celui de COX-1. COX-2 dispose également d'une poche supplémentaire (« side pocket ») qui augmente le volume du site actif de 17 % par rapport à celui de COX-1 et lui autorise une plus grande variété de substrat (Luong et coll, 1996 ; Kurumbail et coll, 1996). De plus, il existe au moins deux conformations possibles pour COX-2 qui possède ainsi une plus grande flexibilité que COX-1 (Luong et coll, 1996).

Ces études cristallographiques ont permis de fournir des bases explicatives aux différences de comportement des AINS vis-à-vis des deux isoenzymes. Par exemple, l'aspirine cause une inhibition irréversible de COX-1 et de COX-2 par modification covalente. Cette réaction se décompose en deux phases : dans un premier temps, l'aspirine se fixe sur l'Arg120 ou 106 par son acide carboxylique puis acétyle la Ser530 dans COX-1 ou 516 dans COX-2. Cependant, le blocage stérique empêche toute fixation du substrat et donc toute synthèse de métabolites dans COX-1 alors que la forme acétylée de COX-2 conserve une activité enzymatique anormale permettant la biotransformation de l'acide arachidonique vers la formation de l'acide 15-hydroxyéicosatétraénoïque (15(R)-HETE). Ceci pourrait être expliqué par la différence de taille entre les deux sites actifs. La structure cristallographique a suggéré que le blocage du site de COX-1 intervienne par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène à une Arg120 polaire. Ce résidu est aussi présent dans COX-2. C'est cette seule différence qui joue un rôle critique

dans la sélectivité d'inhibition de nombreux AINS. En position 523, se trouve une Ile dans COX-1 et une Val dans COX-2. La Val, résidu plus petit avec un groupement méthyle, laisse un espace plus grand dans le canal de COX-2, donnant accès à la poche latérale, où se fixe la majorité des molécules sélectives (Hawkey, 1999). La seule substitution d'une Ile en Val, est suffisante pour passer d'une COX-1 non inhibée, à une COX-1 pouvant être inhibée par des inhibiteurs sélectifs de COX-2 (Luong et coll, 1996 ; Gierse et coll, 1995). Ce remplacement supprime ainsi la restriction existant à l'entrée du canal secondaire et permet l'accès à des inhibiteurs de plus grosse taille (Wong et coll, 1997).

Le développement de molécules basé sur cette observation est illustré par les AINS de la série du flurbiprofène. En effet, la modification progressive et l'extension du groupement méthyle du flurbiprofène conduit à des molécules ayant une sélectivité accrue vis-à-vis de COX-2, du fait de leur capacité à se fixer à la poche latérale, et de leur trop grosse taille pour se fixer au site de COX-1. La plupart des inhibiteurs sélectifs de COX-2 ont une structure qui leur permet une fixation au niveau de la poche latérale, souvent par un groupement sulphonyle, sulfone ou sulphonamide.

D'autre part, la cinétique d'inhibition de COX-2 est différente de celle de COX-1. L'inhibition de COX-1 est instantanée et il s'agit d'une inhibition compétitive réversible, comme le laisse présager un processus impliquant une liaison hydrogène. L'inhibition de COX-2 est dépendante du temps, la sélectivité se développant en 15 à 30 minutes (le Dup 967 n'a pas été identifié initialement comme un inhibiteur sélectif à cause de ce délai) et est irréversible. Le rôle de la liaison covalente et/ou des changements conformationnels secondaires dans le canal ne sont pas encore clairement établis (Hawkey, 1999).

1.1.1.b. Régions N et C-terminales

Les principales différences existant entre les deux isoformes de COX se situent dans les régions N- et C-terminales. En effet, COX-2 présente un peptide signal tronqué, un site de glycosylation supplémentaire du côté N-terminal (Nemeth et coll, 2001) et une insertion de 18 aa à l'extrémité C-terminale (propriété utilisée pour générer des anticorps anti-COX-2) (Smith et DeWitt, 1996). Les régions C-terminales des deux isoformes correspondent à un signal de rétention et d'adressage de type KDEL par le RE (Smith et DeWitt, 1996 ; Pelham, 1989).

Des études des régions C-terminales des deux isoformes pour la rétention au niveau du RE par des expériences de mutagenèse ont donné des résultats assez contradictoires (Ren et coll, 1995 ; Regier et coll, 1995 ; Song et coll, 1996 ; Li et coll, 1998). Des mutations d'un résidu Leu dans la région C-terminale de COX-1 conduisent à la perte de l'activité cyclooxygénase. Par contre au niveau de la région équivalente de COX-2, la mutation de ce même résidu en Asp ne conduit qu'à une légère perte d'activité. Ces résultats suggèrent que la région C-terminale a un rôle différent sur la fonction catalytique des deux isoformes de COX. Cette région présente un intérêt supplémentaire car, dans les cellules transfectées exprimant COX-1, elle est accessible depuis le cytoplasme alors que les autres épitopes ne sont accessibles qu'à partir de la lumière du RE (Ren et coll, 1994 ; Otto et Smith, 1994).

Des travaux récents (Guo et Kulmacz, 2000) ont confirmé que la région C-terminale joue un rôle dans l'activité catalytique de la COX, avec une influence plus prononcée dans COX-1

que dans COX-2. Cette différence s'expliquerait par le fait que la région C-terminale de COX-2 s'étend plus loin dans le domaine glomérulaire.

Tableau 1 Comparaison des principales caractéristiques des deux isoformes de cyclooxygénase

Critères	COX-1	COX-2
Homologies	<ul style="list-style-type: none"> - protéines monotopiques membranaires, glycosylées - 60% d'homologies de leurs séquences en aa - conservation des domaines catalytiques - propriétés enzymatiques : K_m et V_{max} voisines pour l'AA 	
Gène		
<i>Localisation</i>	Chr (murin), 9 (homme)	Chr 1
<i>Taille</i>	22-23 kb	8-9 kb
Régulation	Expression constitutionnelle Faiblement inductible	Faiblement constitutionnelle Fortement inductible
Niveau d'expression	Peut augmenter de 2 à 4 fois	Peut augmenter de 10 à 80 fois
Effets des glucocorticoïdes	Peu ou pas d'inhibition directe de l'activité enzymatique	Réduction de la transcription et inhibition de la traduction
ARN messenger	2,8 kb	4,1 kb
	éléments de transcription en 5' (AP-2 et NF-IL-6)	nombreux motifs AUUUA dans 3'UTR éléments de transcription en 5' (NF-kB, AP-2, NF-IL-6 et CRE)
Protéines		
<i>Nbre d'aa</i>	599-602	603-604
<i>PM</i>	~ 70 kDa, 3 sites de glycosylation	~ 70 kDa, 4 sites de glycosylation
<i>Peptide signal</i>	25 aa	17 aa absents dans la protéine mature
<i>Région C-term</i>		insertion de 18 aa supplémentaires

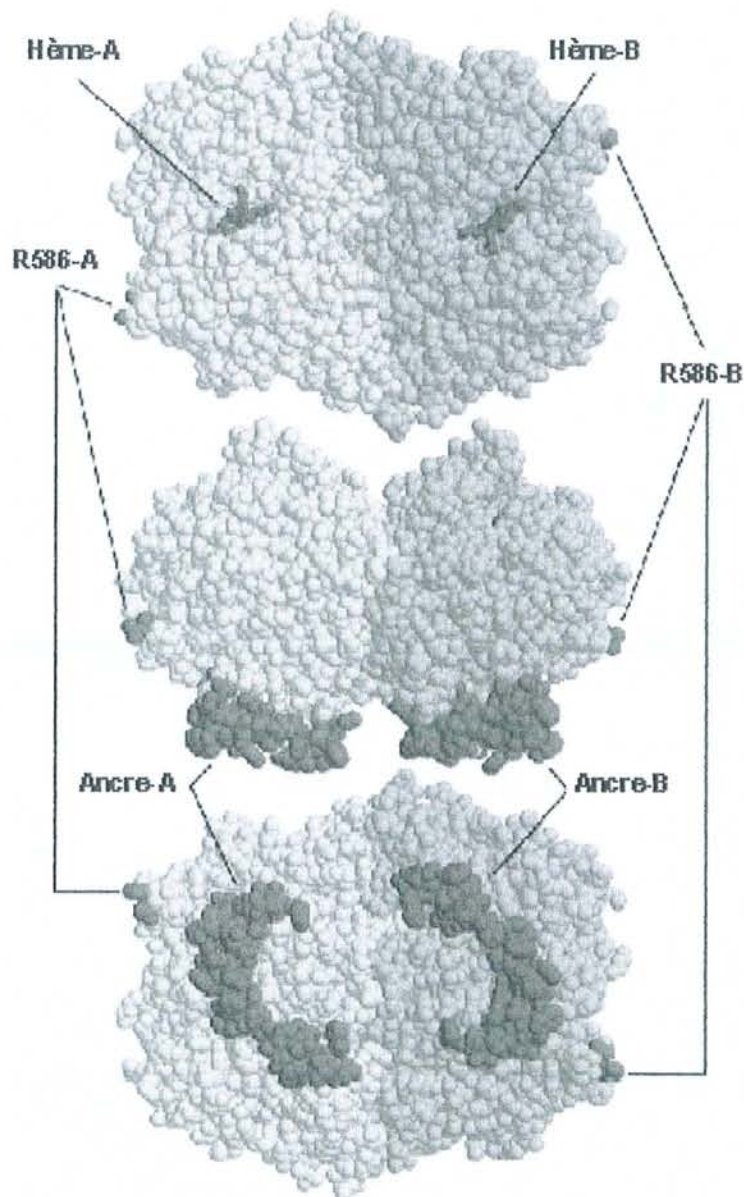


Figure 4 Structure cristallographique d'un dimère de COX-1 ovine, solubilisé par du détergent. Trois parties sont localisées : 1) le groupement hème prosthétique ; 2) le dernier résidu aa identifié, Arg586 (R586); 3) le domaine de liaison à la membrane (d'après Guo et Kulmacz, 2000).

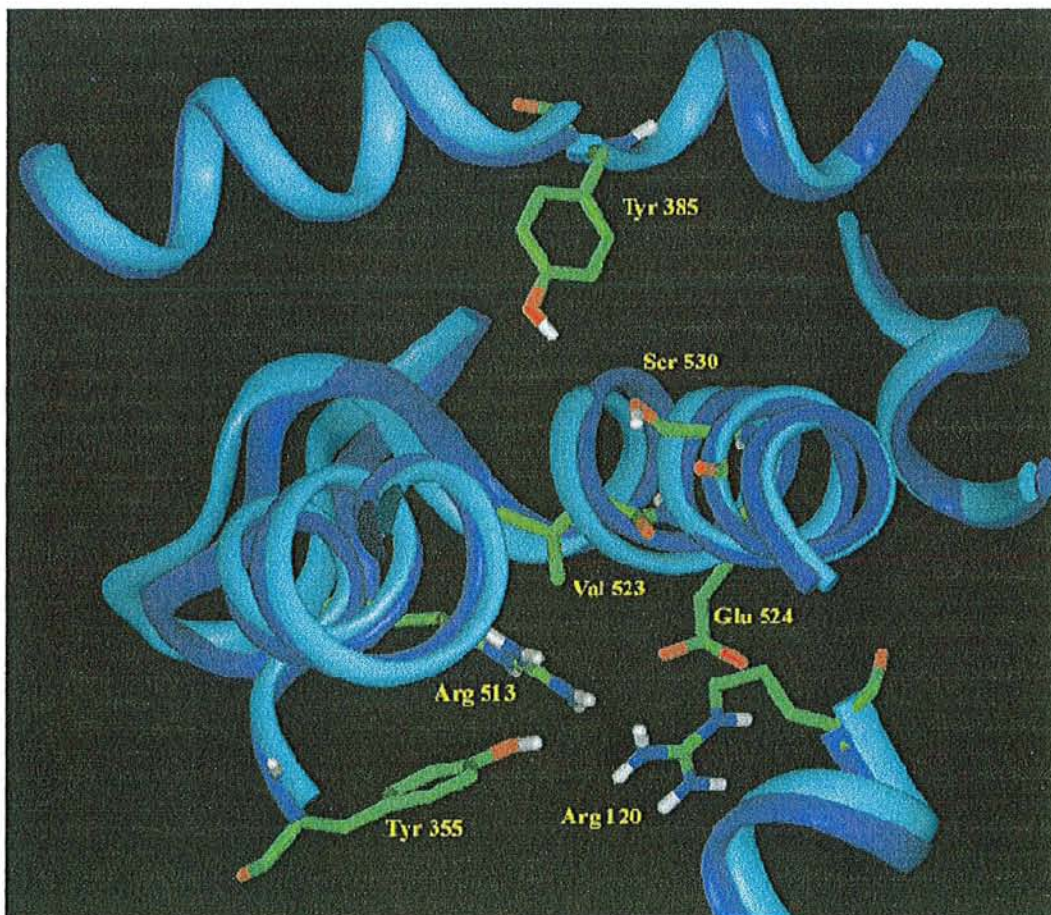
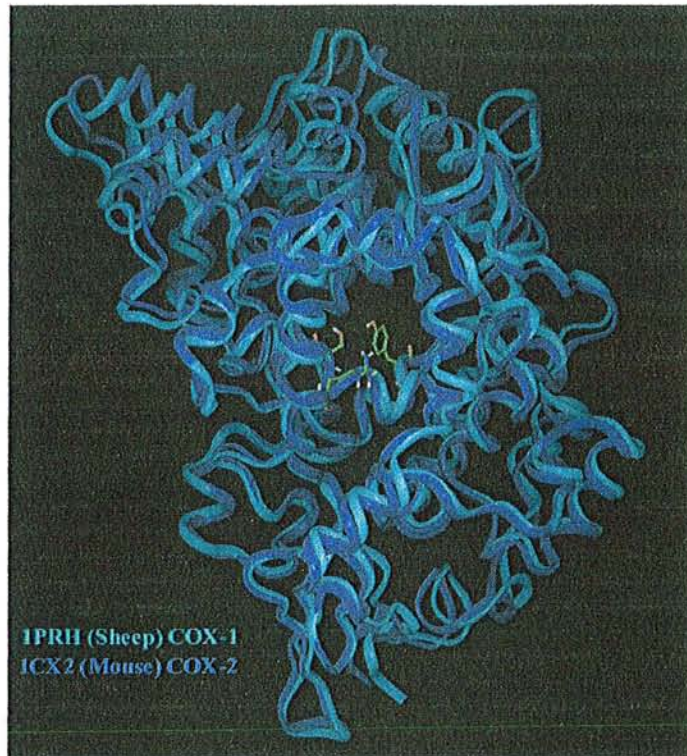


Figure 5 Alignement des structures en ruban de COX-1 ovine (bleu) et de COX-2 murine (violet) et agrandissement du site actif pour localiser les aa importants

I.1.2. Gènes

I.1.2.a. Structure des gènes

Le gène de COX-1 est un gène domestique de 22 kb avec 11 exons, (Figure 6) (Kraemer et coll, 1992), localisé sur le chromosome 9 chez l'homme. Son messager n'a pas de TATA box (Figure 7). Le gène de COX-2, localisé sur le chromosome 1 chez l'homme (Yokoyama et coll, 1989), est compact (8,3 kb), avec seulement 10 exons, dont le plus grand code pour une région 3'-UTR. Le gène de COX-2 humaine (Figure 6) a une taille de 8,3 kb, et est identique aux gènes de COX-2 de souris et de poulet mais plus petit que le gène de COX-1 humaine (22 kb). La séquence de son ADNc présente 60% d'homologie avec celle du gène non-inductible. L'ARNm de la forme inductible mesure 4,5 kb alors que celui de la forme constitutive mesure 2,8 kb (Tableau 2).

Le niveau d'expression de COX-2, normalement très faible, est régulé de façon stricte par un certain nombre de facteurs incluant les cytokines, les messagers intracellulaires et la disponibilité en substrat.

I.1.2.b. Régulation

L'activité enzymatique des COXs présente un renouvellement rapide, impliquant la régulation de l'expression au niveau du gène. L'expression des gènes de COX-1 et de COX-2 est largement régulée. Les deux isoenzymes de COX diffèrent au niveau de leur régulation. Elles peuvent être régulées aussi bien au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-transcriptionnel. Le gène de COX-1 a un promoteur caractéristique d'un gène domestique (ne possédant pas de TATA box) alors que celui de COX-2 a les caractéristiques d'un gène précoce (Herschman, 1991). La région 5'-UTR de COX-2 comprend différentes séquences de régulation dont une TATA box et plusieurs éléments activateurs inductibles, dont les éléments promoteurs pour le NF- κ B (-223/-214) et le facteur nucléaire interleukine-6 (CEBP/NF-IL6 ; -132/-124) et l'élément de réponse à l'AMPc (CRE/E-box ; -59/-49) (Figure 8) (Appleby et coll, 1994). Ces éléments sont impliqués dans la régulation du gène par les endotoxines (Mestre et coll, 2000). Deux sites AP-2, trois sites SP1 et un site Ets-1 ont également été identifiés (Figure 8).

Le gène de COX-2 est rapidement induit en réponse à des promoteurs de tumeurs, des cytokines et des facteurs de croissance (Smith et DeWitt, 1996). De plus, l'expression est régulée, positivement ou négativement, par des oncogènes et p53 (Subbaramaiah et coll, 1996 ; Kutchera et coll, 1996 ; Sheng et coll, 1997). L'induction rapide de COX-2 fait intervenir une cascade de réactions impliquant les protéines kinases et de nombreux facteurs de transcription dont NF- κ B (Hwang et coll, 1998). L'élément CRE est impliqué dans la transcription de COX-2 au niveau du promoteur chez la souris et dans les cellules endothéliales (Wadleigh et coll, 2000 ; Xie et Herschman, 1995). Les éléments CRE et E-box semblent fortement impliqués dans l'augmentation de l'expression de COX-2 et la synthèse des PGs, notamment dans les macrophages (Mestre et coll, 2001). Les kinases MAPK/ERK (MEK1) et la kinase N-terminale c-Jun (JNK) prennent part à l'induction par l'intermédiaire d'une protéine adapter.

La région 3' non-traduite de son message, contenant 22 séquences AUUUA (dites de Shaw-Kamen) (Appleby et coll, 1994) lui confère également une certaine instabilité et d'ailleurs certaines cytokines proinflammatoires comme l'IL-1 β pourraient favoriser la traduction de COX-2 en stabilisant ses messages (Ristimäki et coll, 1996). En revanche, les glucocorticoïdes (dexaméthasone, DEX) qui sont capables de bloquer la transcription de COX-2, favoriseraient la dégradation de ses messages (Masferrer et coll, 1990). La cartographie de la région 3' a montré que cette région peut subir une polyadénylation alternative, conduisant à l'existence de deux isoformes distinctes d'ARNm : COX-2_{4,6} et COX-2_{2,8} (Ristimäki et coll, 1996). Après le traitement par la DEX, la forme COX-2_{4,6} décroît plus rapidement alors que la forme COX-2_{2,8}, suggérant que les éléments dans la 3'-UTR participent à la déstabilisation du message. D'autres études de mutagenèse ont montré que les domaines induits par les cytokines et les domaines d'instabilité sont dissociables (Gou et coll, 1998). Plusieurs protéines capables de se lier aux ARNm ont été identifiées comme des régulateurs de leur stabilité. Il faut maintenant réussir à établir par quels mécanismes moléculaires l'ARNm de COX-2 est régulé et dégradé, et comment ceci contribue à l'expression du gène dans des conditions physiologique et pathologique. Récemment (Faour et coll, 2001), il a été montré que le message de COX-2 pouvait être stabilisé, par l'intermédiaire de p38, dans les synoviocytes par les PGE₂.

Les glucocorticoïdes, comme la dexaméthasone, se lient à leur récepteur membranaire, puis traversent la membrane pour interagir avec des récepteurs intra-cellulaires (Truss et coll, 1993). La liaison du ligand sur son récepteur provoque la translocation du complexe dans le noyau, où ils modulent l'expression de gènes de façon positive ou négative (Bamberger et coll, 1996). L'inhibition de la transcription du gène de COX-2 serait due à l'association des glucocorticoïdes avec Rel A, la sous-unité de p56 de NF- κ B (Caldenhoven et coll, 1995).

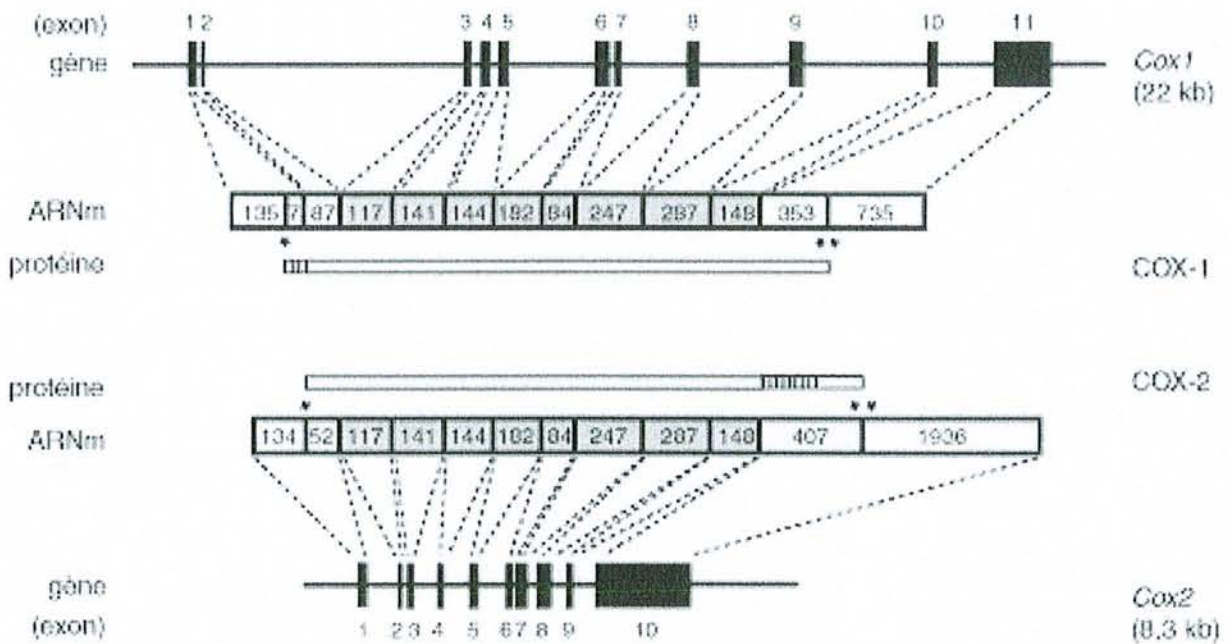


Figure 6 Structure des gènes de COX-1 et de COX-2 humains et représentation schématique de leurs transcrits (ARNm et protéine)



Figure 7 Représentation schématique de la séquence promotrice du gène humain de COX-1, avec les facteurs de transcription AP-2, Myb, GATA, Sp1, NF-IL6 et Sp1 (d'après Subbaramaiha et coll, 1997).

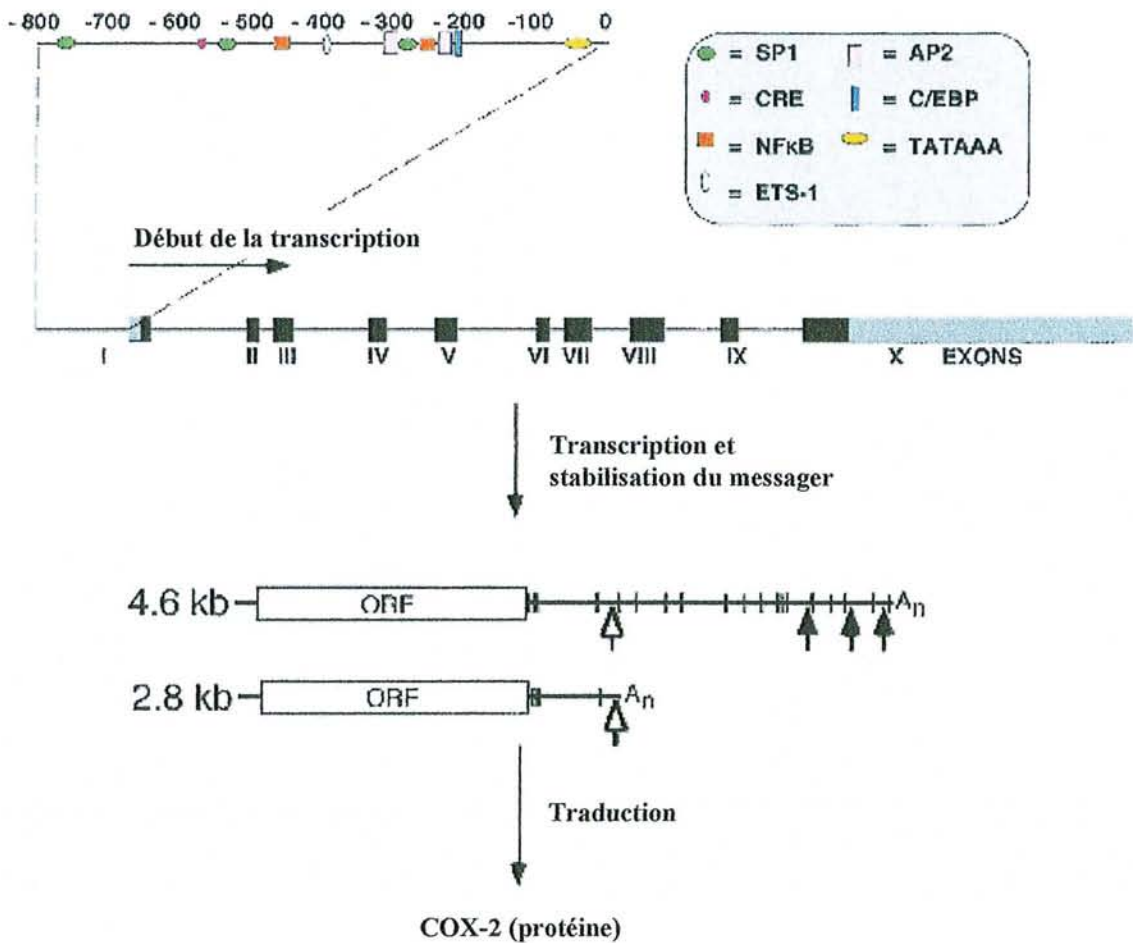


Figure 8 Représentation schématique du gène de COX-2 humaine et des différents éléments du promoteur (Sp1, CRE, NF-κB, ETS-1, AP2, C/EBP et la boîte TATA). Deux isoformes de l'ARNm de COX-2 sont formées par une polyadénylation alternative (indiquée par les flèches). Les ARNm ont plusieurs répétitions du motif AUUUA (indiquée par les lignes verticales). L'ARNm de 4,6 kb est plus instable que celui de 2,8 kb. La régulation de l'expression de COX-2 fait intervenir des contrôles transcriptionnels tout comme un contrôle de la stabilité du messenger (d'après Hla et coll, 1999).

I.2. Localisation cellulaire

Les COXs sont toutes deux des enzymes membranaires monotopiques, présentes au niveau de la membrane du RE et de l'enveloppe nucléaire (Tableau 2). Récemment, il a été montré (Spencer et coll, 1998) que les deux isoformes de COX sont présentes en quantités égales au niveau des feuillettes interne et externe de la membrane nucléaire de divers types cellulaires. Ces résultats sont cohérents avec une répartition uniforme de COX-1 et -2 dans les membranes cellulaires et ne confirment pas les premières études ayant suggéré une localisation nucléaire préférentielle de COX-2 (Morita et coll, 1995). D'autre part, une forme soluble de COX-2 a été récemment mise en évidence dans le cytosol de macrophages murins stimulés par du LPS et cette dernière semble provenir d'une néosynthèse et non d'un relargage à partir des membranes (Patel et coll, 1999).

Tableau 2 Localisation, rôles et substrats des deux isoformes de COX

Critères	COX-1	COX-2
Localisation subcellulaire		Membranaire
Localisation tissulaire		
<i>Type cellulaire</i>	- Plaquettes, cellules endothéliales	- Prostate, poumons, cerveau - Monocytes activés ou fibroblastes - Synoviocytes et chondrocytes au cours de l'inflammation
<i>Organe ou tissu</i>	- Estomac, rein, prostate et la plupart des autres tissus	- La plupart des tissus après stimulation par hormones, cytokines, facteurs de croissance ou ester de phorbol - Follicules avant l'ovulation
Rôle	Enzyme de régulation : production basale des PGs - réponses autocrine/paracrine des cellules aux hormones circulantes - physiologie rénale, digestive et vasculaire	Enzyme d'adaptation : production stimulée des prostaglandines - processus inflammatoire (gènes induits par la réaction inflammatoire) - croissance cellulaire (gène précoce contrôlant la mitogenèse) - transduction du signal hormonal régulant l'ovulation
Substrat	AA (C20 :4)	AA (C20 :4) acide gras en C18 et C20 : 3

I.3. Activité catalytique

La réaction chimique catalysée par les COXs est décomposée en deux étapes, impliquant successivement les deux activités de l'enzyme. L'AA, substrat majoritaire de l'enzyme (Leslie, 1997) doit être libéré au préalable par une phospholipase A₂ (PLA₂) à partir des phospholipides membranaires (Figure 9).

La première étape de la réaction catalysée par la COX, au niveau du site cyclooxygénasique, consiste en une réaction de cyclooxygénation de l'AA pour former du PGG₂. Ensuite, le PGG₂ est réduit au niveau du site peroxydase, impliquant la réduction du groupement

hydroperoxyde du PGG₂ pour former l'alcool PGH₂ (Figure 9). La réaction chimique telle qu'elle a été postulée par Dietz et coll, 1988, a subi un certain nombre de modifications permettant d'expliquer la stimulation de l'activité cyclooxygénasique par les agents réducteurs (Bambai et Kulmacz, 2000). En effet, les agents réducteurs comme le phénol peuvent avoir un effet double sur l'activité COX, à forte concentration (en général >1mM), le phénol inhibe l'activité COX alors qu'à faible dose (entre 0,1 et 1 mM), il l'active.

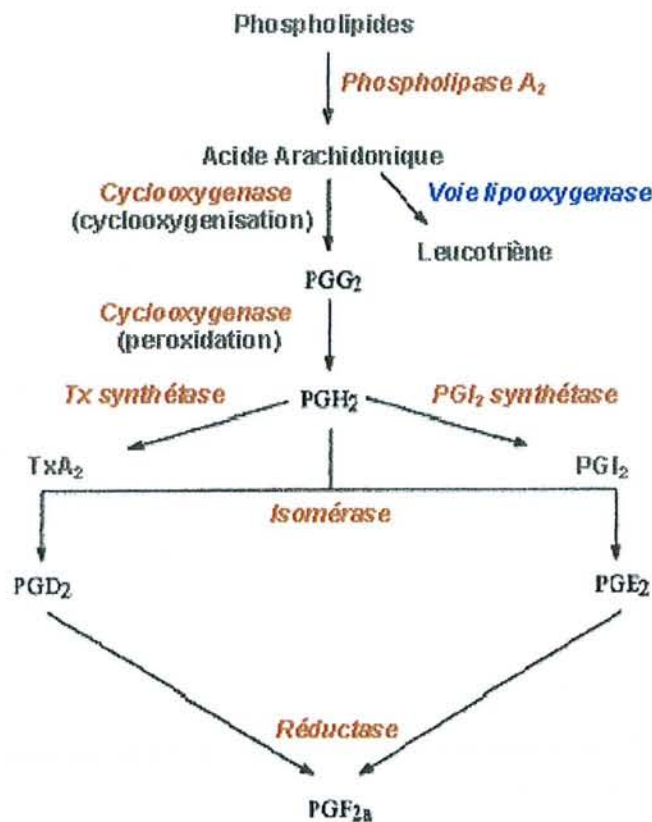


Figure 9 Principales voies de biosynthèse utilisant l'AA comme substrat

1.3.1. Régulation de l'activité enzymatique

Différents facteurs peuvent expliquer la différence de régulation cellulaire de la réaction catalysée par les deux isoformes de la COX (Kulmacz, 1998) :

- L'accès des deux isoformes à différents pools d'AA, dû à une compartimentation différentielle ou à un couplage avec différentes phospholipases ou protéines accessoires. COX-2 formerait des PGs à partir de l'AA endogène, alors que COX-1 utilise l'AA exogène (Reddy et coll, 1994). Les deux isoformes de COX ont une répartition similaire, dans les membranes externes de différents types cellulaires (Spencer et coll, 1998). D'autres enzymes de synthèse des PGs et des précurseurs lipidiques sont aussi trouvés en dehors des membranes, dans le cytosol (Bozza et coll, 1997).
- La dépendance de l'activité des isoformes de COX à la concentration en AA.

- La différence dans la concentration de peroxyde d'hydrogène activateur (Lu et coll, 1999). L'activation de l'enzyme passe par la réaction entre le site peroxydase de l'enzyme avec le peroxyde d'hydrogène. Une molécule de PGHS conduit à la formation de 10^3 molécules de PGG₂, lui-même un peroxyde d'hydrogène (Marshall et coll, 1987), dont la diffusion conduit à l'activation massive de la PGHS suivant un puissant rétrocontrôle. Le contrôle de cette réaction peut être réalisé grâce à des piègeurs de peroxyde d'hydrogène, comme la glutathion peroxydase qui capte le PGG₂. L'activation de COX-2 nécessite une quantité moindre de peroxyde (2 nM) que celle de COX-1. Les deux isoformes répondent donc toutes deux de façon différente au peroxyde, même si elles sont présentes dans le même compartiment (Capdevila et coll, 1995 ; Kulmacz et Hwang, 1995). Ainsi, une fraction considérable de COX-2 sera catalytiquement active, alors qu'une grande partie de COX-1 restera latente. Dans ces conditions, la libération de l'AA par les phospholipases cellulaires permet la synthèse de PGs par COX-2 mais pas par COX-1. La régulation de l'activité des COXs par le peroxyde d'hydrogène permet de relier cette voie à celle du NO, car le peroxynitrite, un métabolite du NO, est un activateur de COX (Landino et coll, 1996 ; Nédélec et coll, 2001).

La première étape de conversion de l'AA en PGH₂ prend place dans le site actif de COX, où deux molécules d'oxygène sont ajoutées à l'arachidonate pour former un intermédiaire bicyclique, le PGG₂. La nature monotopique des COXs a une signification dans la fixation du substrat. Le domaine de fixation à la membrane permet non seulement l'ancrage de la protéine à la membrane mais correspond aussi à l'entrée du site actif. Cette particularité structurale permet à l'AA de passer directement du compartiment hydrophobe de la bicouche lipidique au site actif de l'enzyme correspondant à un long canal hydrophobe (25Å) qui débute au niveau du domaine de liaison à la membrane en Tyr385 (Picot et coll, 1994). Dans ce canal hydrophobe, on trouve quelques aa polaires, dont l'Arg120 et la Ser530, qui présentent un intérêt particulier. L'Arg120 positionnée à mi-chemin entre l'entrée et le site actif et la Ser530 correspondant au site d'acétylation de l'aspirine (Loll et coll, 1995) (Figure 10 et Figure 11). On ne connaît pas actuellement les détails de la fixation de l'AA au site actif de COX, mais la connaissance de la stœchiométrie des réactions chimiques et les structures cristallographiques ont permis d'expliquer le rôle de certaines positions clés. Notamment, l'Arg 120, l'un des quelques aa chargés du site actif de COX-1, interagit avec les groupements carboxyliques des AINS de la classe des acides arylpropioniques, comme le flurbiprofène. Des études de mutagenèse ont clairement établi que cet aa joue un rôle critique pour l'activité COX et dans l'inhibition de COX-1 par la plupart des AINS, par la fixation au groupement carboxylique de l'AA ou d'autres acides gras ou encore des AINS acides. A partir de l'Arg120, l'AA suivrait sa voie jusqu'au site actif où il formerait probablement une structure en tête d'épingle entre ses carbones 9 et 11. La liaison de l'arachidonate pourrait alors se faire de telle sorte que la Tyr385 puisse enlever le pro(S) hydrogène du carbone 13 de l'acide gras (Figure 11). Il existe deux mécanismes possibles pour la fixation de la portion restante du substrat : les carbones 14-20 pourraient retourner vers le canal hydrophobe ou se bloquer dans un « cul de sac » du site actif.

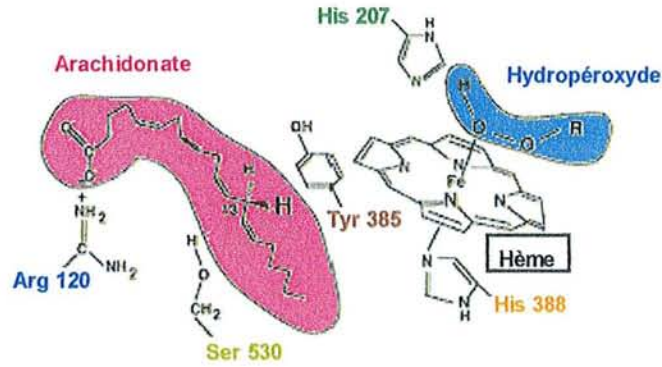


Figure 10 Interaction du substrat avec le site actif de COX

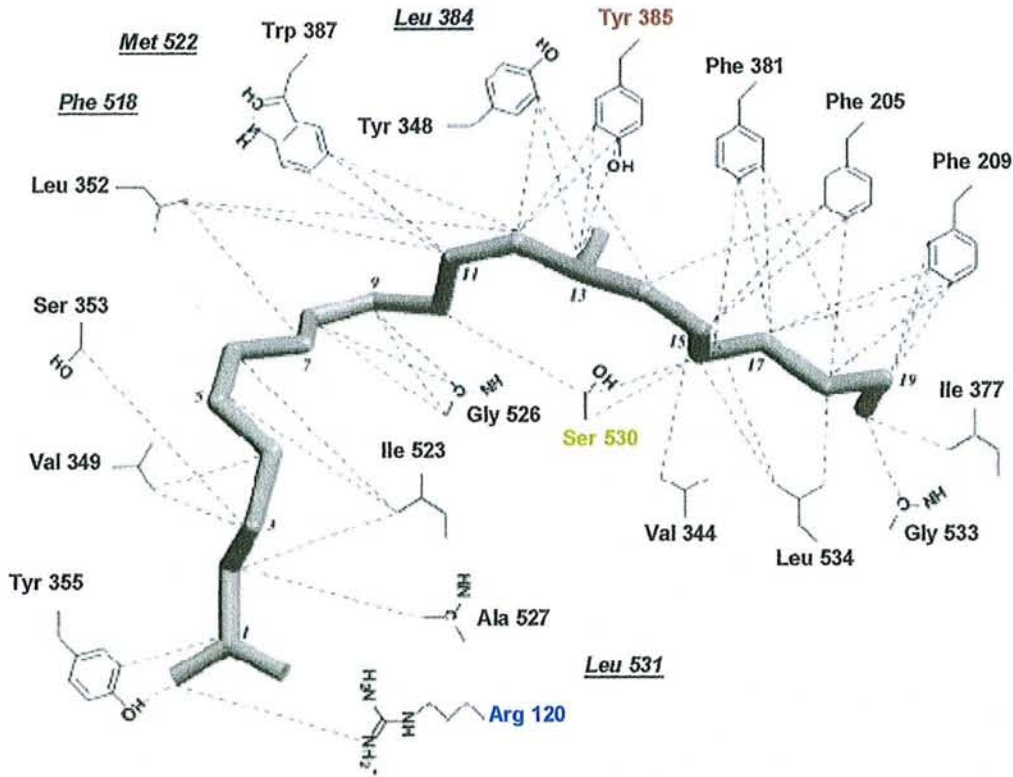


Figure 11 Représentation schématique des interactions entre l'AA et les aa du site actif bordant le canal hydrophobe de COX. Les lignes pointillées représentent des interactions $\leq 4\text{\AA}$ entre les chaînes latérales des aa avec des atomes de carbone ou d'oxygène de l'AA. Les résidus indiqués en italique et soulignés n'interagissent pas avec l'AA (d'après Thuresson et coll, 2001).

1.3.2. Interaction avec le substrat

Les COXs catalysent deux réactions séparées, dont une réaction de cyclooxygénation sur le site cyclooxygénasique, dans laquelle l'AA est converti en PGG₂ et une réaction de

peroxydation, consistant en la réduction de deux électrons, dans laquelle le PGG₂ est converti en PGH₂ (Smith et coll, 2000 ; Marnett et coll, 1999). Ces réactions se produisent dans des sites physiquement distincts mais qui interagissent. La réaction débute par l'étape limitante de libération du 13-pro-S-hydrogène à partir de l'AA, conduisant à la formation du radical arachidonyl (Tsai et coll, 1995). Puis, l'addition séquentielle d'un oxygène sur les carbones C-11 et C-15 permet la formation du PGG₂. Les AINS entrent en compétition avec l'AA pour le site de fixation sur le site cyclooxygénasique (Picot et coll, 1994 ; Kurumbail et coll, 1996 ; Luong et coll, 1996), inhibant ainsi l'activité cyclooxygénasique et épargnant l'activité peroxydasique (Mizuno et coll, 1982 ; Rome et coll, 1975 ; Marchall et Kulmacz, 1988). L'AA se lie au site actif cyclooxygénasique dans une conformation en L, en établissant au total 48 interactions hydrophobes et deux contacts hydrophiles avec la protéine, qui impliquent 19 résidus aa différents (Figure 11). Plusieurs aa situés dans la première partie du canal hydrophobe interagissent avec d'autres résidus, mais restent au-delà de la distance d'une liaison de Van der Waals. Même si l'AA peut adopter 10⁷ conformations différentes (Gund et Shen, 1977), seules 3 sont compétentes d'un point de vue catalytique (Thuresson et coll, 2000) : une conduit à la synthèse de PGG₂, une autre au (11*R*)-HPETE et la troisième aux (15*R*)- et (15*S*)-HPETE.

Des études de mutation des acides aminés du site actif de l'enzyme ont montré, que i) le groupement guanidine de l'Arg120 était important pour la liaison de forte affinité de l'AA à COX-1 (Mancini et coll, 1995 ; Bhattacharyya et coll, 1996), mais pas pour la liaison à COX-2 (Greig et coll, 1997 ; Rieke et coll, 1999) ; ii) la Tyr385 était impliqué par son groupement tyrosyl à l'extraction du 13-pro-S-hydrogène de l'AA (Shimokawa et coll, 1990 ; Tsai et coll, 1994) ; et iii) la Ser530 et l'Ile523 étaient déterminantes dans la spécificité d'inhibition (DeWitt et coll, 1990 ; Shimokawa et Smith, 1992 ; Guo et coll, 1996 ; Wong et coll, 1997 ; Gierse et coll, 1996). Une étude récente (Thuresson et coll, 2001) a montré l'importance de 7 résidus bordant le canal hydrophobe de COX-1 parmi les 19 impliqués dans l'interaction de l'AA avec le site de COX, dans le positionnement de l'AA, dans l'affinité de la liaison de l'AA au site actif de COX-1 ou dans l'optimisation de la réaction catalysée par COX-1 (Figure 11 et Tableau 3).

La formation d'un complexe entre la COX et l'AINS provoque des changements conformationnels de l'enzyme. Cette hypothèse est supportée par différentes études ayant montré que les inhibiteurs responsables d'une inhibition dépendante du temps protègent contre des clivages protéolytiques en Arg277, résidu de la boucle située à distance du site de fixation des inhibiteurs (Kulmacz et Lands, 1982 ; Chen et coll, 1987 ; Kulmacz, 1989 ; Kalgutkar et coll, 1996). Les inhibiteurs compétitifs sont aussi capables de protéger COX-1, mais cette protection n'est pas aussi complète ou aussi longue qu'avec les AINS provoquant une inhibition dépendante du temps (Kalgutkar et coll, 1996). L'hème, qui se lie à un site différent de celui de liaison de l'AINS, protège aussi l'enzyme de la protéolyse, reflétant la flexibilité globale de ces enzymes.

La comparaison des structures cristallographiques des isoenzymes de COX interagissant avec différents AINS responsables d'une inhibition dépendante du temps, n'a révélé que de très faibles différences structurales. De plus, il a été montré que la fixation d'un AINS réduit la

flexibilité intrinsèque de l'enzyme, au niveau des aa 118 à 122 et de l'hélice D du domaine de liaison à la membrane de COX-2 murine (Figure 3) (Smith et coll, 2000 ; Kurumbail et coll, 1996). Dans COX-2 humaine, la fixation d'un AINS expérimental, RS57067, conduit à une flexion de 2,3 Å de la chaîne latérale de l'Arg106, ainsi qu'à une détorsion partielle de l'hélice D (Luong et coll, 1996). D'autres changements structuraux subtils surviennent dans COX-2 après la fixation d'un AINS (Kurumbail et coll, 1996), mais aucun n'est suffisamment important pour induire la protection protéolytique ou l'inhibition dépendante du temps.

Tableau 3 Rôle critique de plusieurs résidus aa dans l'interaction de l'AA avec COX-1 pour la synthèse de PGG₂ (d'après Thuresson et coll, 2001)

Résidu et position	Rôle dans l'interaction COX-1-AA
Tyr385	Fournit un radical tyrosyl nécessaire à l'initiation de l'étape limitante de la réaction
Tyr348 et Gly533	Interaction hydrophobe entre l'AA et l'enzyme
Arg120	Interaction ionique avec le groupement carboxyle terminal de l'AA = <i>liaison haute affinité du substrat</i>
Val349, Trp387, Leu534	Interaction hydrophobe = <i>positionnement de l'AA</i>
Val349	Stabilisation de la partie carboxyle de l'AA = <i>positionnement correct du C-9 par rapport au C-11 pour une synthèse efficace d'endoperoxyde</i>
Trp387	Stabilisation de l'interaction avec le C-11
Leu534	Fournit l'encombrement stérique bloquant l'oxygénation primitive en C-15

I.3.2. Rôle du monoxyde d'azote (NO)

Le NO est un médiateur aux fonctions multiples, produit et agissant sur différentes cellules, notamment au cours de l'inflammation et de la destruction auto-immune des tissus (Bredt et Snyder, 1994). Les concentrations en NO dans le liquide synovial de patients arthritiques sont élevées (Farrell et coll, 1992 ; Belmont et coll, 1997) et l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) a été mise en évidence dans la membrane synoviale au cours de la polyarthrite rhumatoïde (McInnes et coll, 1996). Ce médiateur pourrait contribuer au maintien de l'inflammation dans la membrane synoviale pendant l'arthrite et participer à sa prolifération.

Plusieurs études récentes ont montré l'existence de relations entre les voies de la NOS et de COX à plusieurs niveaux (Nédélec et coll, 2001 ; Swierkosz et coll, 1995 ; Salvemini et coll, 1993). iNOS et COX-2 sont en effet, co-induites au cours de plusieurs processus, dont l'inflammation (Lianos et coll, 1998 ; Goodwin et coll, 1999).

Certaines molécules dérivées du NO activent les COXs (Salvemini et coll, 1993). Le NO potentialise l'expression de COX-2 induite par l'IL-1 dans les cellules mésangiales de rat (Tetsuka et coll, 1996). Une étude récente (Honda et coll, 2000) a montré que le NO généré de façon exogène était capable de stimuler l'expression de COX-2 dans les synoviocytes arthritiques humains (mis en présence d'un donneur de NO). Cette étude a permis de montrer

que le NO joue un rôle critique dans la régulation de l'expression de COX-2 dans la membrane synoviale au cours de l'arthrite et que le NO et COX-2 pourraient interagir de façon fonctionnelle pour augmenter la réaction inflammatoire en induisant d'autres médiateurs de l'inflammation. L'hème de la cyclooxygénase peut réagir avec le NO (Goodwin et coll, 1998) et des études suggèrent que le peroxy-nitrite, espèce très réactive formée à partir du NO et de l'anion superoxyde, peut aussi réagir directement avec COX pour activer la synthèse des PGs (Goodwin et coll, 1999). Le peroxy-nitrite peut aussi provoquer la nitration des résidus tyrosine de la COX conduisant à la diminution de la synthèse de PGE₂ (Boulos et coll, 2000). Le peroxy-nitrite diminue la production de PGE₂ dans la membrane de la vessie des rats contrôles ou injectés par du LPS. Les différentes quantités d'anion superoxyde présentes ou la différence de sensibilité des COXs au peroxy-nitrite par rapport à d'autres enzymes, pouvant diminuer de façon non-spécifique la production de PG, peuvent expliquer les différences observées dans la régulation de la synthèse des PGs par le NO et le peroxy-nitrite dans la vessie (Wheeler et coll, 2001).

La régulation s'effectue au niveau transcriptionnelle. Le facteur de transcription NF-κB apparaît être un élément clé de l'expression de COX-2 (Crofford et coll, 1994). De plus, il a été montré que les donneurs de NO activaient la translocation de NF-κB dans le noyau des cellules sanguines périphériques mononucléaires humaines (Lander et coll, 1993). La DEX inhibe COX-2 induite par le NO dans les synoviocytes humains.

Les inhibiteurs de NO diminuent la libération des PGE₂ induites par les cytokines dans les cellules astrogliales (Mollace et coll, 1998) et la production des PGE₂ par les enzymes recombinantes de COX-1 et de COX-2 peut être potentialisée par les donneurs de NO (Salvemini et coll, 1993). De plus, les taux de PGE₂ urinaires sont diminués de 78% dans des souris déficientes en iNOS comparés au niveau des souris contrôles (Marnett et coll, 2000). Dans la vessie de rat, les niveaux d'induction de l'expression de COX-2 et de la iNOS sont différents. L'ARNm de COX-2 est exprimé de façon constitutive alors que l'ARNm de la iNOS n'est détecté qu'après une stimulation par le LPS (Olsson et coll, 1998). Les taux élevés de PGE₂ urinaires mesurés au cours d'une infection des voies urinaires peuvent être dus à l'amplification de la réponse à un agent pathogène par la COX et la NOS.

La stimulation au LPS peut provoquer un influx de neutrophiles qui sont connus pour exprimer COX-2 (Minghetti et coll, 1999) et pour induire la iNOS.

I.4. Fonction : de la synthèse des PGs aux rôles physiopathologiques des COXs

Les COXs assurent la transformation de l'AA en endoperoxyde G₂ (PGG₂), puis en endoperoxyde H₂ (PGH₂) (Smith et coll, 1996). Ensuite, selon le contenu enzymatique des tissus concernés, le PGH₂ conduit, par réduction ou isomérisation, à la formation de différents eicosanoïdes (prostaglandines primaires (PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, ...), prostacycline (PGI₂) ou thromboxane (Tx) A₂) dotés de fonctions biologiques variées (Figure 12).

I.4.1. Les prostaglandines

I.4.1.a. Nomenclature

Les prostanoïdes ont été découverts pour la première fois par Von Euler dans les années 1930 par l'observation des effets du liquide séminal sur le muscle utérin (Von Euler, 1936). Ils forment une famille complexe d'acides gras à 20 carbones, biologiquement importants à laquelle appartiennent les prostaglandines (PG) (Needleman et coll, 1986 ; Samuelsson, 1983 ; Spector et coll, 1988).

Tous les produits synthétisés par les COXs dérivent de deux acides gras essentiels : l'acide linoléique (18:2) et l'acide linoléique (18:3). Ces acides gras subissent une élongation et/ou une désaturation au niveau hépatique. Cette réaction est à l'origine de la formation de trois acides gras polyinsaturés précurseurs de chacune des séries de PG : l'acide eicosatriénoïque (20:3) pour la série 1 (Lands et Samuelsson, 1968), l'acide eicosatétraénoïque ou acide arachidonique (20:4) pour la série 2 (Bergstrom et coll, 1964) et l'acide eicosapentaénoïque (20 :5) pour la série 3 (Needleman et coll, 1979). Ces trois acides gras polyinsaturés passent dans le sang puis sont incorporés sous la forme d'esters de glycérol dans les lipides membranaires (Henry, 1988).

L'AA, chez l'homme, est le précurseur le plus abondant, les PGs sont donc majoritairement de la série 2. Cependant, la disponibilité et le type de précurseur peuvent être influencés par le régime alimentaire. Ainsi, les acides gras ω -3 polyinsaturés présents dans certaines huiles végétales et dans les huiles de poissons, d'origine alimentaire ou apportés sous forme de médicament (Maxepa®), favorisent les changements de composition des acides gras membranaires ainsi que la formation de métabolites de la séries 3 qui sont nettement moins inflammatoires que ceux issus de la biotransformation de l'AA (série 2) (Mathias et Dupont, 1979). Ces changements s'accompagnent également de modifications significatives dans l'hémostase (allongement du temps de saignement par défaut de synthèse de TxA₂).

L'AA, ainsi libéré, peut ensuite entrer dans deux voies de biosynthèse : celle catalysée par les COX permettant la synthèse des PGs et celle catalysée par les lipoxygénases (LOXs) permettant la synthèse des leucotriènes (LT) et de dérivés hydroxylés.

Les PGs sont classées en différentes catégories : les endoperoxydes (PGG, PGH), les PGs primaires (PGA, PGB, PGC, PGD, PGE, PGF) (la lettre indiquant la position de l'atome d'oxygène dans le cycle cyclopentane), les thromboxanes (TxA, TxB), la prostacycline (PGI) et ses dérivés (6-kéto-PGF_α).

Tous ces dérivés sont répartis en séries 1, 2 ou 3 selon le nombre de doubles liaisons sur la chaîne latérale, dépendamment de l'acide gras précurseur (Figure 12). Les PGs ne possédant qu'une seule double liaison Δ 13 *trans* (20:4 ; 13), appartiennent à la série 1. Les PG ayant deux doubles liaisons Δ 5 *cis* et Δ 13 *trans* (20:4 ; 5,13) appartiennent à la série 2. La série 3 comprend les PG qui ont une troisième double liaison Δ 17 *trans* (20:4 ;5,13,17) (Versteeg et coll, 1999).

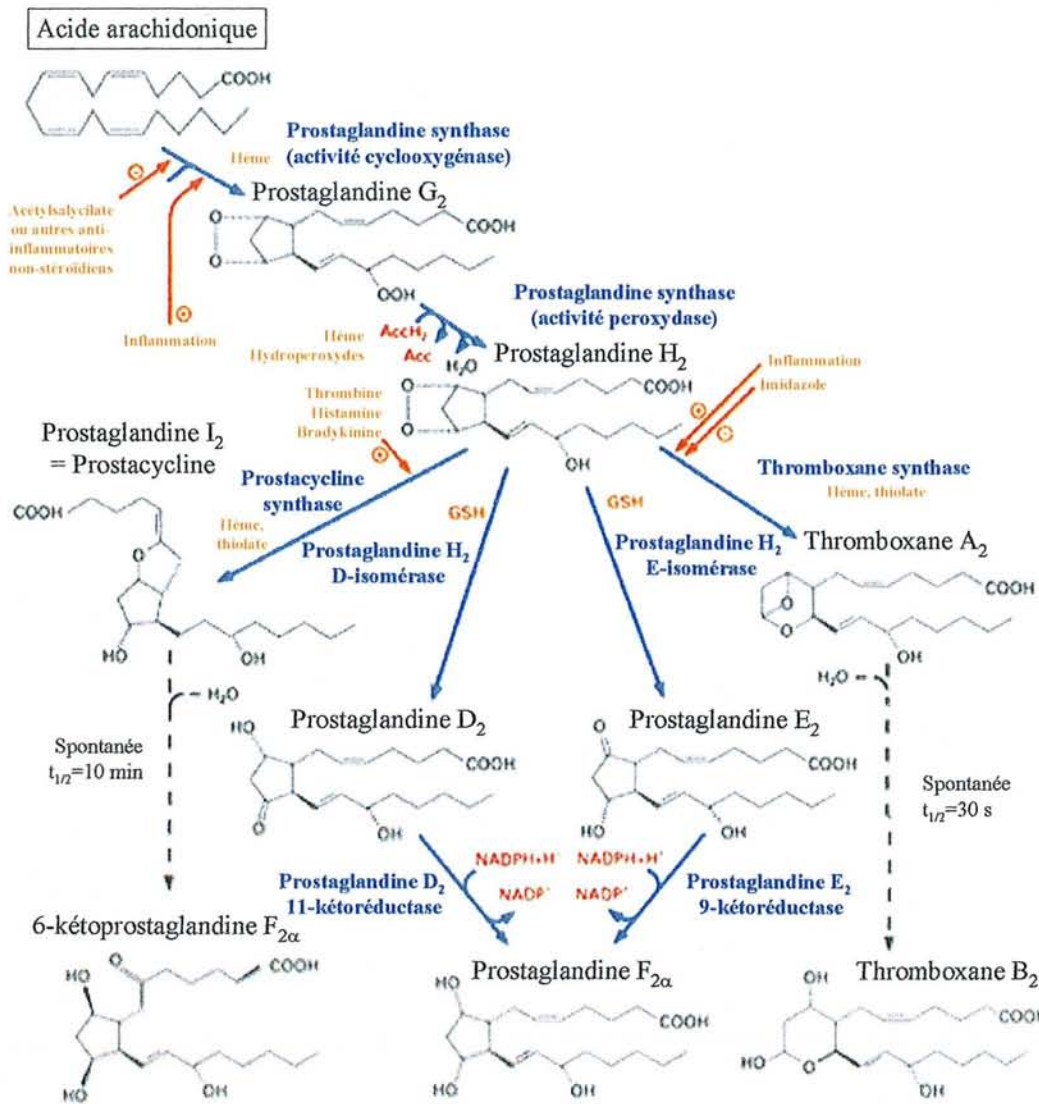


Figure 12 Biosynthèse des eicosanoïdes à partir de l'AA

I.4.1.b. Les endoperoxydes

Les endoperoxydes (PGG₂, PGH₂) sont caractérisés par la présence d'un pont peroxyde entre les carbones 9 et 11 du cyclopentane (Figure 12). Ce sont des intermédiaires instables dans la voie de biotransformation de l'AA en PG primaires, thromboxanes et en prostacyclines (Falardeau, 1988).

Les endoperoxydes à durée de vie courte (ne dépassant pas 4 à 5 minutes) subissent des transformations biochimiques dépendantes de l'activité des isomérases cellulaires. Les PGH₂ peuvent être transformés en PGE₂ sous l'action d'une 9-kéto-isomérase ou en PGF_{2α} sous l'action d'une réductase ou encore en PGD₂ sous l'action d'une 11-isomérase. Les PGH₂ peuvent également se transformer en TxA₂ sous l'action d'une thromboxane synthase, puis être rapidement hydrolysés (en 30 secondes environ) en un dérivé stable mais inactif le TxB₂.

Enfin, le PGH_2 peut être transformé en PGI_2 , sous l'action d'une prostacycline synthase, qui est ensuite rapidement hydrolysée en un métabolite stable, le 6-kéto $\text{PGF}_{1\alpha}$.

1.4.1.c. Les prostaglandines primaires

Elles possèdent 3 caractéristiques structurales communes : une double liaison entre les carbones 13 et 14 en position *trans*, une fonction hydroxyle en position 15α de configuration absolue S et une fonction oxygénée en C9 (alcool ou cétone).

Elles sont réparties en différentes classes selon la nature des substituants du noyau cyclopentane et de son degré de saturation. Ainsi, les PGA, B et C présentent une cétone en C9 et une double liaison dans le cycle cyclopentane : entre les carbones 10 et 11 pour les PGA, entre les carbones 8 et 12 pour les PGB et entre les carbones 11 et 12 pour les PGC. Par contre, les PGD, E et F ont un cycle cyclopentane saturé et différents groupes en position 9 et 11 : un alcool en 9 et une cétone en 11 pour les PGD, une cétone en 9 et un alcool en 11 pour les PGE et deux alcools en position 9 et 11 pour les PGF (Figure 13).

Les PGF peuvent être nommées différemment : α , pour les PGs naturelles et β pour les PGs de synthèse.

1.4.1.d. Les thromboxanes

Le noyau cyclopentane des PGH_2 est transformé en cycle tétrahydropyrane sous l'action d'une thromboxane synthase pour former le TxA_2 . Cette molécule conserve un pont endoperoxyde en position 9-11 qui est très instable et est rapidement métabolisé en TxB_2 (Despré et coll, 1989).

1.4.1.e. La prostacycline et ses dérivés

La prostacycline est caractérisée par la présence d'un cycle tétrahydrofurane accolé au noyau cyclopentane. Elle est synthétisée à partir de l'endoperoxyde PGH_2 sous l'action d'une prostacycline synthase et est rapidement transformée en son métabolite stable, le 6-céto $\text{PG}_{1\alpha}$.

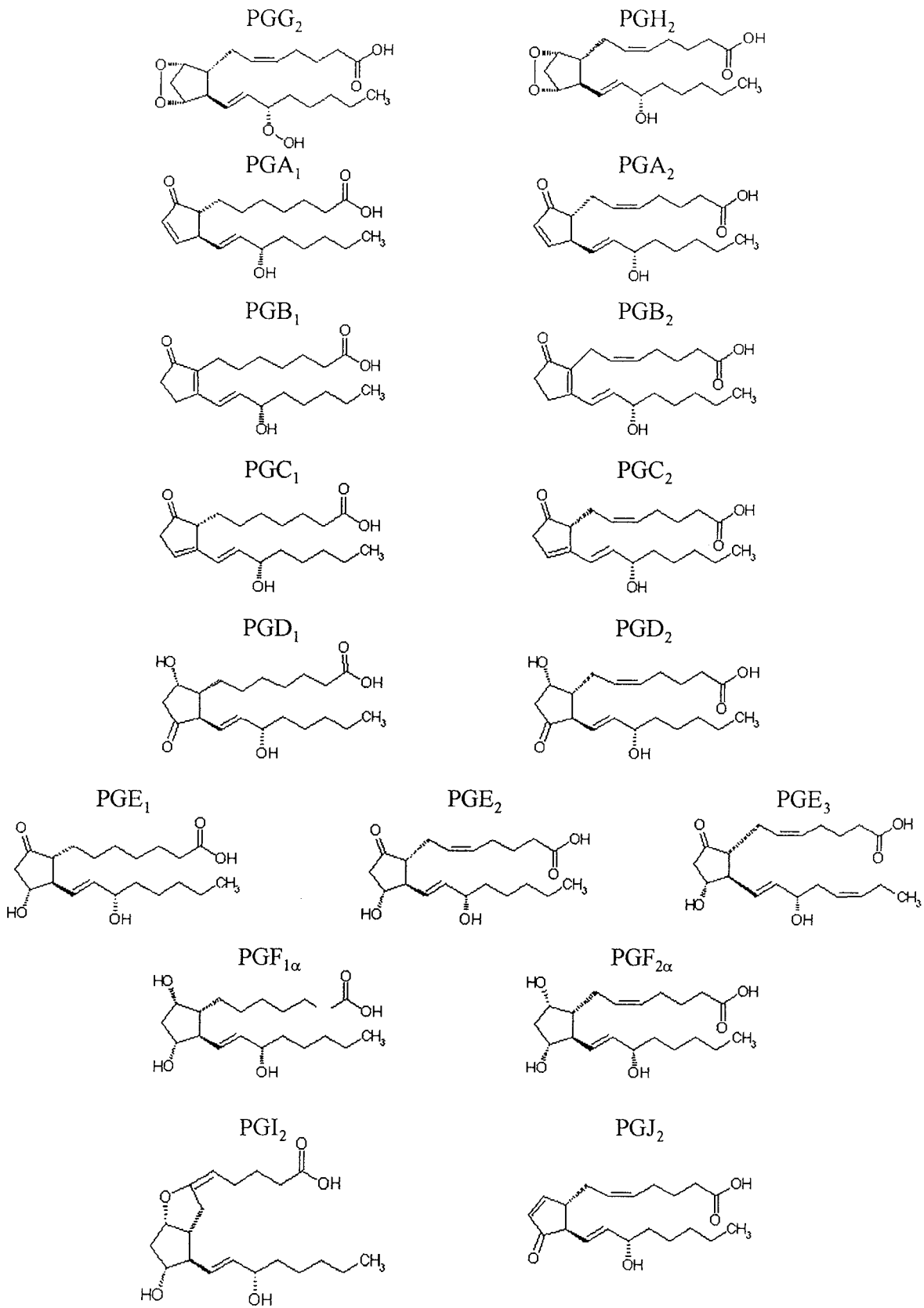


Figure 13 Structure chimique des prostaglandines primaires

1.4.2. Phospholipase A₂ (PLA₂) et prostaglandines synthases (PGS)

La biosynthèse des PGs par les cyclooxygénases implique une réaction d'oxydation, suivie d'une réaction d'isomérisation des dérivés de l'AA. Cette transformation se décompose en 3 réactions enzymatiques (Figure 14). L'étape initiale correspond à la libération de l'AA à partir des phospholipides membranaires par l'action des PLA₂ cytosoliques (cPLA₂) (groupe IVA) et sécrétoires (sPLA₂) (groupes IIA, IID, V et X) (Lin et coll, 1993 ; Murakami et coll, 1998 ; Murakami et coll, 1999a, b et c ; Murakami et coll, 2001 ; Bezzine et coll, 2000 ; Hanasaki et coll, 1999 ; Shinohara et coll, 1999 ; Han et coll, 1999). La PLA₂ impliquée dépend du type cellulaire et du stimulus (Dennis et coll, 1997). Il en existe 5 groupes qui diffèrent par leur fonction, leur localisation, leur régulation, leur séquence et leur dépendance vis-à-vis des ions divalents. Les trois premiers groupes correspondent à des enzymes extracellulaires ou PLA₂ secrétées (sPLA₂). Le quatrième groupe ne comporte qu'une seule enzyme intracellulaire ou PLA₂ cytosolique (cPLA₂). Cette forme est spécifique des phospholipides porteurs de l'AA. Elle nécessite de faibles concentrations de calcium, compatibles avec une activation intracytosolique. Cette enzyme cytosolique est transloquée vers la membrane lors de l'activation cellulaire. Elle est ensuite activée par des kinases de la famille des protéines kinases C (PKC) ou par des « mitogen activating protein » (MAP) kinases. Le cinquième groupe de PLA₂ comprend une enzyme intracytoplasmique, spécifique des phospholipides porteurs d'AA, mais ne requiert pas de calcium pour son activation.

Les sPLA₂ de type II et V impliquées dans l'inflammation requièrent des concentrations millimolaires pour son activation, alors que la forme cytosolique a besoin de concentrations nanomolaires (Mukherjee et coll, 1994). Ainsi, la forme sécrétoire est constamment activée par les concentrations extracellulaires de calcium, alors que la forme cytosolique est induite au cours de l'inflammation par l'augmentation du calcium intracellulaire causée par des médiateurs comme la bradykinine (Burch et Axelrod, 1987 ; Ricupero et coll, 1993). L'importance de la bradykinine a d'ailleurs été montrée (Saunders et coll, 1999) dans l'induction de la PLA₂ nécessaire à la synthèse des PGE₂ par les COXs, et notamment dans les maladies chroniques comme l'asthme ou la polyarthrite rhumatoïde. L'AA libéré est ensuite métabolisé en PGG₂ puis PGH₂ par l'une ou l'autre des isoformes de COX. La PGH₂ est ensuite convertie en différentes PGs actives (TxA₂, PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} ou PGI₂) par leurs PGs synthases (PGS) respectives (Figure 12). Ces enzymes ont des structures différentes et leur distribution présente une spécificité cellulaire et tissulaire. L'AA peut également être libéré de façon accessoire, après action des phospholipases C (PLC), D (PLD) ou d'un PLA₂ spécifique des acides phosphatidiques. L'étape de libération de l'AA est capitale car elle constitue l'étape limitante de la biosynthèse des eicosanoïdes (Lands, 1979).

COX-1, isoforme constitutive, réalise, en général, la biosynthèse immédiate de PGs, intervenant quelques minutes après une stimulation par les ions Ca²⁺, alors que COX-2, isoforme inductible, est un élément indispensable à la biosynthèse retardée des PGs, pouvant se prolonger plusieurs heures après le stimulus inflammatoire. En revanche, COX-2 inductible est capable de réaliser une réponse immédiate (« priming response ») dans des cellules traitées pour la première fois avec un stimulus pro-inflammatoire et en présence de ionophore

(Murakami et coll, 2000a ; Naraba et coll, 1998 ; Chen et coll, 1997 ; Balsinde et coll, 1999 ; Kuwata et coll, 1998 ; Murakami et coll, 1997).

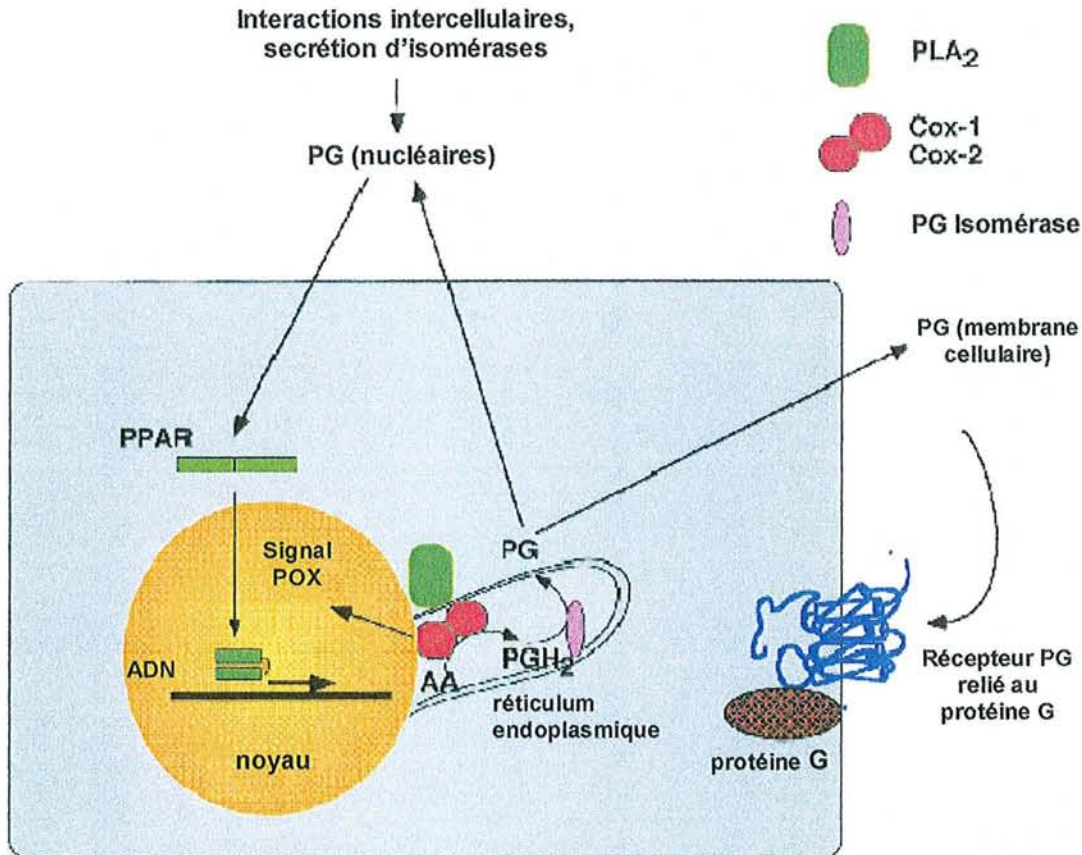


Figure 14 Voie de signalisation de COX-1 et de COX-2. Les isoenzymes de la COX sont activées par la translocation de la PLA₂ vers la membrane du RE et du noyau, libérant l'AA. Elles catalysent la formation de PGH₂ qui est converti en prostanoides plus stables par les isomérases spécifiques des tissus. L'activité exagérée des isoenzymes de la COX libère des PGH₂ pouvant être métabolisées par les voies de transformation des eicosanoïdes transcellulaires ou par des isomérases sécrétées. Les prostanoides sécrétés comme les PGE₂ agissent sur des récepteurs couplés aux protéines G de façon autocrine ou paracrine. Au contraire, les PG nucléaires sont transportées dans la cellule pour se lier au récepteur des PPAR qui sont transloqués dans le noyau pour activer la transcription. Les COXs peuvent aussi induire une signalisation redox par l'activité peroxydase (d'après Hla et coll, 1999).

Le mécanisme précis de la ségrégation fonctionnelle entre les deux isoenzymes de COX n'est pas encore clairement établi. Cependant, des couplages spécifiques entre les COXs et des sous-types de PLA₂ ont été proposés (Reddy et coll, 1997 ; Bingham et coll, 1996). Les études de co-expression ont montré que la cPLA₂ et différentes sPLA₂ étaient capables de fournir l'AA à COX-1 aussi bien qu'à COX-2 lors des réponses immédiates et uniquement à COX-2 lors des réponses retardées (Murakami et coll, 1999a, b et c ; Murakami et coll, 2001). De plus, d'autres études chez des souris n'exprimant pas la cPLA₂ ont apporté les preuves du rôle essentiel de cette isoforme dans la synthèse de PGs lors des réponses immédiate et retardée (Uozimi et coll, 1997 ; Bonventre et coll, 1997). Le rôle des sPLA₂ dans l'une ou l'autre des réponses apparaît être cellule-spécifique et dépendante de leur

expression, de leur sécrétion et de leur localisation dans des microdomaines particuliers de la membrane (Murakami et coll, 1999b ; Murakami et coll, 2001).

Il a également été suggéré que les deux isoformes de COX pourraient être couplées différemment avec des PG synthases spécifiques. Par exemple, les macrophages péritonéaux de rat produisent du TxA₂ et des PGD₂ par l'intermédiaire de COX-1 dans le cas d'une réponse immédiate induite avec l'ionophore A23187 et des PGE₂ et de la PGI₂ dans le cas d'une réponse retardée après stimulation par du LPS (Harada et coll, 1996 ; Naraba et coll, 1998 ; Brock et coll, 1999). La production de TxA₂ par les plaquettes sanguines activées dépend entièrement de COX-1 (Langenbach et coll, 1995), alors que la production de PGE₂ par les ostéoblastes est réalisée par COX-2, malgré la présence de COX-1 (Chen et coll, 1997 ; Murakami et coll, 1997). Dans le cas de la production biphasique de PGD₂ par les mastocytes activés de souris, seule COX-1 est sollicitée lors de la réponse immédiate et seule COX-2 l'est lors de la réponse retardée (Murakami et coll, 1994 ; Murakami et coll, 1995a et b ; Reddy et Herschman, 1997). Dans un modèle d'inflammation chez le rat, les inhibiteurs sélectifs de COX-2 réduisent l'accumulation des PGE₂, mais pas celle des autres PGs (Naraba et coll, 1998). Qui plus est, les différences de cinétique des diverses synthases pourraient compliquer le schéma de synthèse des PGs (Penglis et coll, 2000).

La conversion du PGH₂ en TxA₂ et PGI₂ est catalysée respectivement par la Tx synthase (TXS) et par la PGI₂ synthase (PGIS), qui appartiennent toutes les deux à la famille des cytochromes P450 et qui sont localisées dans la membrane du RE et dans les membranes périnucléaires (Ohashi et coll, 1992 ; Hara et coll, 1994 ; Lin et coll, 1998). La PGD₂ synthase (PGDS), qui réalise l'isomérisation du PGH₂ en PGD₂, existe sous deux formes distinctes, une forme sécrétoire essentiellement présente dans le système nerveux (L-PGDS) (Nagata et coll, 1991) et une forme hématopoïétique (H-PGDS) de la famille de la glutathion S-transférase cytosolique (Kanaoka et coll, 1997). Les PGF synthases présentent dans les poumons et le foie sont des protéines cytosoliques qui ont de fortes homologues avec les enzymes de la famille des aldo-kéto réductases (Watanabe et coll, 1985 ; Suzuki et coll, 1999). Plusieurs protéines ayant une activité PGE₂ synthase (PGES) ont été identifiées. On peut distinguer la forme constitutive cytosolique (cPGES), identique à p23 (Tanioka et coll, 2000), la forme inducible, attachée à la membrane périnucléaire (mPGES), initialement appelée MGST1-L1 pour Membrane-Bound GST1-like-1 (Murakami et coll, 2000 ; Jakobsson et coll, 1999 ; Thoren et Jakobsson, 2000) et les formes cytosoliques μ2 et μ3 de la glutathion S-transférase (Beuckmann et coll, 2000).

L'expression de la mPGES est fortement induite par les stimuli pro-inflammatoires *in vitro* et sur le site de l'inflammation *in vivo*. Elle est inhibée par les glucocorticoïdes (Murakami et coll, 2000 ; Jakobsson et coll, 1999 ; Thoren et Jakobsson, 2000). Il a été montré plus récemment que la cPGES et la mPGES favorisaient respectivement COX-1 et COX-2 pour la conversion de l'AA endogène ou exogène en PGE₂ (Tanioka et coll, 2000 ; Murakami et coll, 2000). Ceci a confirmé l'hypothèse qui proposait un lien fonctionnel spécifique entre les isoenzymes de COX et les PG synthases terminales (Figure 15). Une étude récente (Ueno et coll, 2001) a permis de classer les PG synthases en 3 catégories en fonction de leur localisation et de leurs préférences pour les COXs : i) les enzymes périnucléaires préférant COX-2 (TXS, PGIS et mPGES) ; ii) les enzymes cytosoliques préférant COX-1 (cPGES) ; et

iii) les enzymes utilisant l'une ou l'autre des COXs en fonction du stimulus (H-PHDS). Il a également été montré que l'altération de la disponibilité en AA, exogène ou endogène, affecte de façon considérable les couplages entre les COXs et les synthèses terminales.

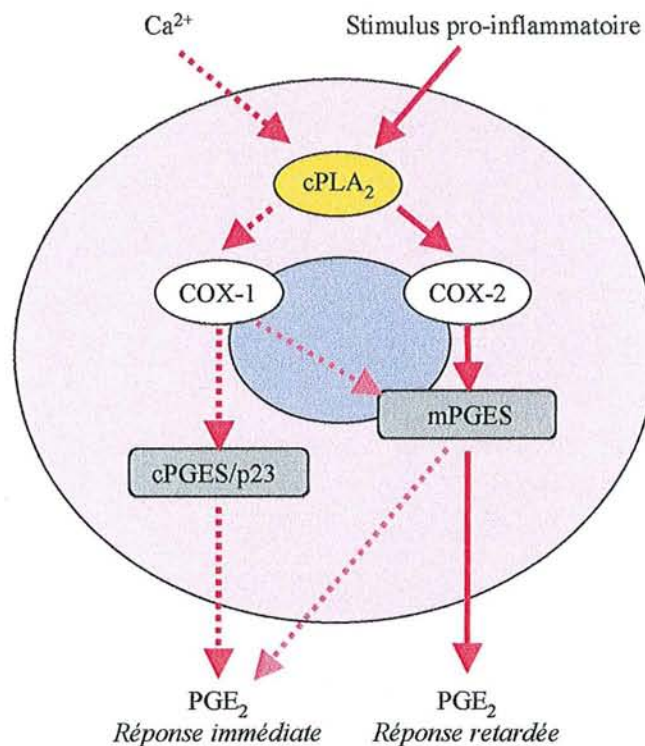


Figure 15 Modèle schématique du couplage fonctionnel entre les COXs et les PGES (d'après Murakami et coll, 2000)

1.4.3. Les récepteurs des prostaglandines

Les PGs sont des médiateurs à action locale (Ferreira et Vane, 1967) dont les concentrations plasmatiques ne dépassent pas 10^{-9} M (Granstrom et Samuelsson, 1978). La synthèse des PGs n'est pas restreinte à un seul organe (Smith, 1986). Elles peuvent sortir de la cellule qui les a synthétisées pour agir sur les récepteurs membranaires spécifiques des cellules voisines (action paracrine) ou de la cellule dont elles sont issues (action autocrine) en tant que premiers messagers.

Ces récepteurs appartiennent à deux types de superfamille de récepteurs : 1) les récepteurs de type rhodopsine couplés à la protéine G ; 2) les récepteurs nucléaires aux hormones ou aux stéroïdes (Versteeg et coll, 1999) (Figure 16).

Les récepteurs des différents eicosanoïdes ont été étudiés grâce à des animaux modifiés pour certains gènes. En effet, il en existe 18 concernant des intermédiaires de la synthèse ou de l'action des eicosanoïdes (Austin et Funk, 1999). Ces animaux ont un développement pour la plupart normal et ne montrent aucun effet notable au niveau anatomique, à l'exception de souris déficientes pour COX-2 ou pour le récepteur EP₄.

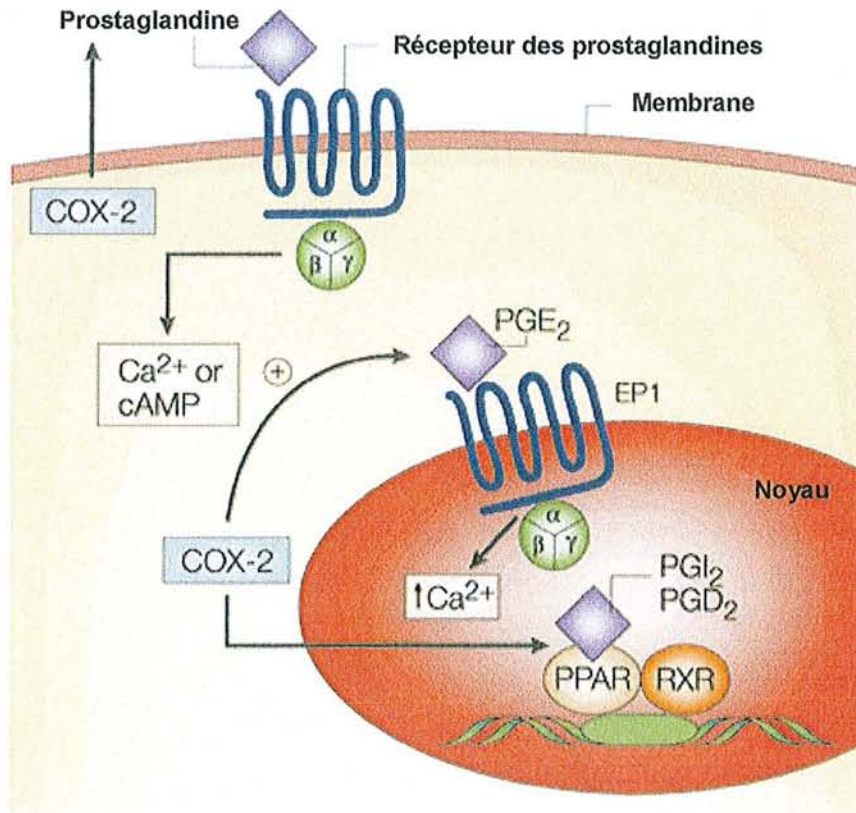


Figure 16 Schématisation des deux types de récepteur aux PGs et de leurs mécanismes d'action (d'après Gupta et Dubois, 2001)

1.4.3.a. Les récepteurs membranaires

Les différentes PGs et les thromboxanes ont des fonctions aussi différentes que la réponse inflammatoire, le contrôle de l'hémodynamique ou l'accouchement. L'expression des récepteurs est spécifique du type cellulaire. Ainsi, le récepteur TP du Tx est principalement trouvé dans les plaquettes, les récepteurs EP₁ dans les fibroblastes, les récepteurs EP₂ et EP₄ dans les cellules musculaires lisses et les récepteurs FP dans les cellules rénales et les astrocytes. Les récepteurs couplés aux protéines G sont formés de 7 domaines transmembranaires (Ushikubi et coll, 1995). Ces récepteurs peuvent être répartis en 3 groupes selon la protéine G avec laquelle ils sont couplés et la réponse cellulaire induite par sa région C terminale.

La première catégorie de récepteurs comprenant les récepteurs de type IP, EP₂, EP₄ et DP (Adie et coll, 1992 ; Reimer et coll, 1992 ; Ichikawa et coll, 1996) conduit à l'activation de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la protéine G_s. La deuxième catégorie comprend les récepteurs de type TP, EP₁ et FP (Mayeux et coll, 1989 ; Watabe et coll, 1993 ; Funck et coll, 1993 ; Watanabe et coll, 1994) et conduit à la mobilisation du Ca²⁺ par la protéine G_q et à l'utilisation du phosphatidylinositol. Le type de récepteur TP peut également activer les protéines G₁₂, G₁₂ et G₁₃ et une forme non-identifiée de 85-kDa (Ushikubi et coll, 1994 ; Offermanns et coll, 1994 ; Knezevic et coll, 1993), impliquées dans le rôle du récepteur TP

dans l'homéostasie. La protéine G couplée au récepteur EP n'a pas encore été identifiée, mais ses effets sont liés à un canal calcium. Le récepteur EP₃ est un sous-type particulier de récepteur (Ichikawa et coll, 1996). En général, il active la protéine G_i (Nishigaki et coll, 1993 ; Schwaner et coll, 1995) mais à cause des différentes formes générées par un épissage alternatif, il est capable d'induire une grande variété d'effets. Les types EP_{3α, β} sont des activateurs de protéine G_i chez la souris mais avec des conséquences différentes (Tanabe et coll, 1992). La forme EP_{3A} bovine active la protéine G_i alors que la forme EP_{3B} active G_s. La forme bovine EP_{3D} stimule les 3 principales protéines G, alors que la forme EP_{3C} est couplée à G₀ (Namba et coll, 1993). Ceci conduit à l'inhibition de la protéine G₀ en augmentant son affinité pour le facteur de dissociation du GTP (Negishi et coll, 1993). Les effets des différents récepteurs EP₃ montrent une certaine spécificité d'espèce.

1.4.3.b. Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs des activateurs de proliférateurs de peroxyosomes (PPARs), membre de la famille des récepteurs nucléaires, comprennent 3 isoformes PPAR_{α, β} et _γ. Elles diffèrent par leur spécificité d'expression et de ligands (Forman et coll, 1996). Le PPAR_α est exprimé de façon prédominante dans les cellules ayant une forte activité catabolique des acides gras comme le cœur, le foie ou les reins, alors que l'expression du PPAR_γ est ubiquitaire. Son rôle n'est pas clairement établi. Il est exprimé de façon prédominante dans les tissus adipeux, la glande surrénale, la rate, le gros intestin et le système immunitaire (Kliwer et coll, 1997 ; Tontonoz et coll, 1994 ; Chawla et coll, 1994 ; Fajas et coll, 1997).

Le PPAR_γ a été identifié comme récepteur des prostanoïdes (Tontonoz et coll, 1994). Il fixe différents ligands dont le 15-Δ¹²⁻¹⁴ prostaglandine J₂ (15d-PGJ₂), un métabolite du PGG₂ et les AINS. Une fois activé, le PPAR_γ forme un hétérodimère avec le récepteur des rétinoïdes (Kliwer et coll, 1992) et ce complexe se fixe à l'ADN sur des séquences spécifiques (éléments de réponse aux proliférateurs de peroxyosomes), conduisant ainsi à l'activation d'un gène cible. Le PPAR_γ peut se fixer à NF-κB et conduire à son inactivation, comme le fait le PPAR_α, récepteur intracellulaire des LTs, et ainsi bloquer la réponse inflammatoire (Ricote et coll, 1998).

Le PPAR_γ est un facteur de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires, dont font partie les récepteurs des glucocorticoïdes (Schoonjans et coll, 1997 ; Mangelsdorf et coll, 1995). Il s'agit d'un facteur important de l'immunomodulation, de la cancérisation et du métabolisme des lipides (Vamecq et Latruffe, 1999). Il est activé par un grand nombre de substances naturelles et artificielles, dont les antidiabétiques thiazolidinediones (comme la troglitazone), les acides gras polyinsaturés, les métabolites du PGD₂, les composés oxydés LDL, les produits des 12- et 15-LOX et par les AINS (Huang et coll, 1999 ; Keller et coll, 1993 ; Lehmann et coll, 1995 ; Lehmann et coll, 1997). Son activation conduit à la régulation négative de l'expression de gène pro-inflammatoire, et à l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses (Ricote et coll, 1998 ; Elstner et coll, 1998 ; Kubota et coll, 1998). De plus, les agonistes du PPAR_γ peuvent inhiber la production des cytokines inflammatoires par les monocytes et l'expression de la iNOS (Jiang et coll, 1998 ; Konig et coll, 1997). Plusieurs études ont mis en évidence le rôle important du PPAR_γ dans la différenciation des adipocytes et dans l'homéostasie du glucose (Spiegelman, 1998). Les PPAR_α et _γ ont tous deux des effets

anti-inflammatoires par l'activation des métabolites de l'AA, comme le PPAR α par le LTB $_4$ (Devchand et coll, 1996) et leurs taux sont augmentés au niveau transcriptionnel par les glucocorticoïdes (Lemberger et coll, 1996).

1.4.4. Conséquences physiopathologiques de l'existence des deux isoformes de COX

Les PGs sont synthétisées de façon ubiquitaire et ont des effets biologiques variés. Elles sont ainsi impliquées dans de nombreux processus, aussi bien physiologiques que pathologiques (Tableau 2). Les différentes PGs peuvent avoir des effets biologiques opposés dans le même organe et une PG donnée peut exercer des effets opposés selon la partie de l'organe considéré (exemple des PGE $_2$ au niveau de l'utérus). De plus, la concentration du composé va conditionner ses effets. En effet, à faible concentration (<1 μ M), les PGE $_2$ potentialisent l'action pro-agrégante de différents stimuli, alors qu'à forte concentration, elles l'inhibent. Enfin, deux PGs appartenant à la même classe, ne différant que par leur degré d'insaturation, comme les PGE $_1$ et les PGE $_2$, peuvent avoir des effets opposés dans le même tissu (comme l'inhibition de l'agrégation plaquettaire par les PGE $_1$ à faible concentration). Ces effets biologiques, parfois contradictoires, pourraient être expliqués par la diversité des récepteurs exprimés selon l'organe considéré, ou encore par les différentes réponses qu'ils peuvent induire, notamment par la diversité des seconds messagers pouvant être impliqués. Elles interviennent dans de nombreuses fonctions métaboliques et endocriniennes, comme la lipolyse, la sécrétion d'insuline ou le remodelage osseux. Seuls les effets biologiques principaux des PGs seront cités ici et ceux présentant un intérêt particulier pour cette étude seront détaillés (Tableau 4).

COX-1 a une fonction domestique en assurant la synthèse des PGs qui régulent l'activité normale des cellules. La concentration de cette isoforme est globalement stable, mais une faible augmentation (2 à 4 fois, Tableau 1) peut survenir après stimulation par des hormones ou des facteurs de croissance (DeWitt, 1991 ; Wu et coll, 1991). La forme constitutive, COX-1, a des fonctions physiologiques clairement identifiées. Elle permet notamment la production de PGI qui, lorsqu'elle est libérée par l'endothélium, est anti-thrombogène (Moncada et coll, 1976) et est cytoprotectrice lorsqu'elle est libérée par la muqueuse gastrique (Whittle et coll, 1980). COX-1 est aussi présente dans les plaquettes sanguines où elle réalise la synthèse de TxA $_2$, permettant l'agrégation plaquettaire pour éviter les saignements (Funk et coll, 1991).

Dans des conditions normales, dans des cellules au repos, COX-2 n'est que peu ou pas détectée, mais son expression est largement augmentée lorsque les cellules sont exposées au LPS, aux esters de phorbol, aux cytokines ou aux facteurs de croissance. Cependant, il existe une COX-2 dont l'expression est constitutive dans certains organes, comme le cerveau ou le rein. Ou encore, c'est l'induction de COX-2 qui produit des PGF $_{2\alpha}$ qui permettent les contractions de l'utérus au moment de l'accouchement.

Une surproduction de PGs est, en revanche, impliquée dans des processus physiopathologiques tels que les maladies cardio-vasculaires, certains cancers (notamment le cancer colorectal) ou les maladies inflammatoires (Dubois et coll, 1998 ; Pairet et Netter, 1999).

Dans des conditions basales, polynucléaires neutrophiles, macrophages et fibroblastes ont peu ou pas d'activité COX alors qu'après un stimulus inflammatoire (cytokines, facteurs de croissance ou LPS), on observe une augmentation de l'activité de l'enzyme (surtout de COX-2) suivie d'une production très importante de PGs (Richardson et Emery, 1996). Au cours de la réaction inflammatoire, la réponse vasculaire précoce (vasodilatation et œdème) implique la libération locale de différents médiateurs de faible poids moléculaire dont l'histamine, la sérotonine, la bradykinine et les PGs. Les PGs seules sont de faibles inducteurs de l'œdème, mais elles agissent en synergie avec les autres médiateurs ou avec le fragment C5a du complément. En revanche, les PGs vasodilatatrices ont un rôle majeur durant les phases aiguës et chroniques de l'inflammation (Portanova et coll, 1996). Ainsi, au cours de la polyarthrite rhumatoïde, les PGs, notamment PGE₂, sont produites de façon exagérée par les tissus synoviaux. Cette dérégulation de synthèse est considérée comme un des éléments clés de l'érosion du cartilage et de l'os juxta-articulaire (Sano et coll, 1992).

Tableau 4 Fonctions physiologiques des deux isoformes de COX

Processus physiologique	COX-1	COX-2	PGs impliquées
Ovulation	Non-essentielle	Essentielle ^{1,2}	PGE ₂
Nidation	Non-essentielle	Essentielle ¹	PGI ₂
Parturition	Essentielle ^{3,6}	Compensatoire ⁴	PGF _{2α}
Résolution de l'inflammation	Non-essentielle	Essentielle ⁵	PGD ₂ , 15-déoxy-PGJ ₂
Agrégation plaquettaire	Essentielle ⁶	Pas d'implication	TxA ₂
Développement périnatal du rein	Non-essentielle ⁶	Essentielle ⁷	Non-déterminé
Développement des cellules T	Spécifique du stade	Spécifique du stade ⁸	PGE ₂
Ulcère gastrique	Inhibition des deux isoformes nécessaires ⁹		Non-déterminé
Cicatrisation d'ulcère	Non-essentielle	Essentielle ^{10,11}	Non-déterminé
Cancer intestinal	Rôles essentiels des deux isoformes ¹²		Non-déterminé

(1 : Lim et coll, 1997 ; 2 : Davis et coll, 1999 ; 3 : Gross et coll, 1998 ; 4 : Gross et coll, 2000 ; 5 : Wallace et coll, 1988 ; 6 : Langenbach et coll, 1995 ; 7 : Komhoff et coll, 2000 ; 8 : Rocca et coll, 1999 ; 9 : Wallace et coll, 2000 ; 10 : Wallace et coll, 1998 ; 11 : Mizuno et coll, 1997 ; 12 : Chulada et coll, 2000)

COX-2 joue un rôle important dans l'inflammation et l'expression des phénomènes douloureux (Seibert et coll, 1994) et c'est l'isoforme qui est prédominante au cours de la phase chronique de l'inflammation (Mitchell et coll, 1995). Elle est responsable de la production de PGs au niveau des sites inflammatoires et son inhibition rendrait compte des propriétés anti-inflammatoires des AINS (Richardson et coll, 1996).

Les PGs issues de COX-2 jouent également un rôle important au niveau du système nerveux. Elles permettent en effet la sensibilisation des nocicepteurs et la transmission de la douleur au niveau spinal et supraspinal (Yamamoto et coll, 1996).

En plus de son rôle sur le site inflammatoire, COX-2 assure un certain nombre de fonctions physiologiques et physiopathologiques. Elle est en effet, exprimée de façon constitutive dans plusieurs tissus, comme le cerveau et le rein, jouant un rôle dans leur maturation et leur fonction. Son expression a été montrée avec celle de COX-1 dans l'épithélium gastro-intestinal apparemment normal, où les deux isoformes semblent contribuer à la synthèse des

PGs cytoprotectrices (Zimmermann et coll, 1998). Elle est également induite à certains sites : dans le rein en cas de restriction en sodium, dans la microglie des centres cognitifs de l'hippocampe et du cortex, dans les adénomes intestinaux et les tumeurs du colon, ou encore dans un certain nombre d'atteintes, comme l'infection par *Helicobacter pylori* (Sawaoka et coll, 1998 ; McCarthy et coll, 1999) ou dans les bordures des ulcères en cicatrisation (Mizuno et coll, 1997).

La formation des vaisseaux ou angiogénèse, est indispensable à la croissance des tumeurs. Les vaisseaux matures expriment COX-1, alors que les vaisseaux nouvellement synthétisés expriment la COX-2 inductible. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle les facteurs de croissance dérivés des tumeurs permettent l'angiogénèse en induisant la production de PGE₂ par COX-2 a été émise (Masferrer et coll, 1990). Les PGs sont connues pour être des molécules pro-angiogènes, contribuant à la croissance des tumeurs en induisant la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins (néo-angiogénèse) qui permettent la viabilité des cellules tumorales et leur croissance. COX-2 est exprimée aussi bien dans les cellules néovasculaires que dans les cellules néoplasiques de tumeurs du colon, du sein, de la prostate et du poumon. L'angiogénèse peut être réduite par les inhibiteurs sélectifs de COX-2, comme le célécoxib chez le rat, par un effet direct sur les cellules endothéliales, en diminuant l'expression des facteurs angiogéniques, comme le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF).

1.4.4.a. Système cardiovasculaire

Les PGs influencent la fonction cardiaque de façon indirecte, en agissant sur la musculature vasculaire lisse. Elles ont des effets myoconstricteurs ou myorelaxants. Ainsi, les PGE₂, E₁, D₂, I₂ et A₂ sont vasodilatatrices, alors que le TxA₂ est vasoconstricteur (Eklund et Carlson, 1980).

1.4.4.b. Hémostase

Le maintien de l'hémostase nécessite la production de TxA₂ et de PGI₂ de façon équilibrée. Le TxA₂, synthétisé de façon exclusive par les plaquettes, est un vasoconstricteur et un agrégant plaquettaire puissant. Au contraire, la PGI₂ produite par les cellules endothéliales vasculaires, est vasodilatatrice et anti-agrégante.

COX-2 permet la synthèse de PGI₂ impliquée dans l'activation des plaquettes dans l'athérosclérose (Fitzgerald et coll, 1984). Mais elle peut aussi être active dans des conditions physiologiques. Les PGI₂ et par conséquent COX-2 contribuent au maintien de l'homéostasie, ce qui limite les conséquences sur l'activation plaquettaire *in vivo*.

La production des PGs par les cellules sanguines (plaquettes ou leucocytes) et leur inhibition par les AINS sont utilisées comme modèle d'étude des pouvoirs inhibiteurs sur les isoformes de COXs (système sang total, Patrignani et coll, 1994 et 1997).

Le TxA₂ est l'eicosanoïde majoritaire et uniquement produit par COX-1 dans les plaquettes sanguines (Funk et coll, 1991 ; Hamberg et coll, 1975). Le dosage du TxB₂, métabolite inactif résultant de l'hydrolyse du TxA₂, dans le sérum reflète l'inhibition de cette isoforme *ex vivo*. Les leucocytes expriment COX-2 quand ils sont stimulés par du LPS *ex vivo* (Hempel et coll, 1994), conduisant à la synthèse de PGE₂ et de TxA₂. L'inhibition de COX-1 par l'aspirine suivie de la stimulation du sang total par le LPS conduit à la synthèse de PGE₂ par COX-2

(Patrignani et coll, 1994). Ainsi, dans ces conditions expérimentales, l'inhibition des PGE₂ reflète l'inhibition de COX-2 *ex vivo*. La plupart des AINS ont été testés dans le système sang total chez l'homme et dans un système modifié (Warner et coll, 1999). Les modifications portent sur la mesure de l'activité COX-2. Les cellules sanguines sont ajoutées à des cellules A549 qui ont été stimulées au préalable par de l'IL-1 β . Le tout est incubé avec du diclofénac 1 mM pendant 30 min pour inhiber plus de 98% de la formation de prostanoïdes. Les PGE₂ dosées sur le plasma reflètent l'activité COX-2 dans les cellules A549.

Il est important de noter qu'une capacité résiduelle de 5 à 10% à former du TxA₂ est suffisante pour maintenir l'agrégation (Reilly et Fitzgerald, 1987).

1.4.4.c. Système respiratoire

Le poumon est un site majeur de synthèse et d'inactivation des PGs. Les rôles tenus par les PGs au niveau du système respiratoire sont aussi bien vasculaires que métaboliques. Les PGs agissent directement sur la musculature lisse bronchique. Le PGF_{2 α} , les endoperoxydes et le TxA₂ sont de puissants bronchoconstricteurs. Les PGE, et plus particulièrement les PGE₁, ont une action hypotensive sur la pression pulmonaire et sont des bronchodilatateurs.

1.4.4.d. Fonction rénale

Le cortex rénal synthétise la PGI₂ et participe au métabolisme des PGs. La médula produit des quantités importantes de PGs, notamment les PGE₂. Les PGE₂, E₁ et I₂ exercent leur rôle de puissants vasodilatateurs, grâce à leurs actions myorelaxantes, par l'intermédiaire du récepteur EP₂. Ceci permet de maintenir la pression de filtration au niveau du glomérule, notamment en cas d'hypoperfusion rénale. La vasodilatation s'accompagne d'une augmentation de l'excrétion d'eau et des électrolytes et de la libération d'hormones comme la rénine (Fisher, 1980). Les différentes PGs synthétisées dans les diverses parties du rein, PGE₂, PGF_{2 α} , PGD₂ et PGI₂, sont responsables de plusieurs aspects de la physiologie rénale, dont la fonction tubulaire, l'hémodynamique rénale, la sécrétion de rénine par l'appareil juxtaglomérulaire avec un effet sur la sécrétion d'aldostérone, l'homéostasie du potassium, et les transports de sodium, d'eau et d'urée (Navar et coll, 1996 ; Frazier et coll, 1992 ; Roman et coll, 1981 ; Breyer et coll, 1998 ; Conte et coll, 1992 ; Kramer et coll, 1985).

De nombreux travaux réalisés au cours de dernières années ont mis en évidence l'expression constitutive de COX-2 dans le rein, et ont pu montrer qu'elle pouvait être augmentée selon les conditions expérimentales ou la situation clinique (Komhoff et coll, 1997 ; Vio et coll, 1997 ; Harris et coll, 1994 ; Khan et coll, 1998 ; Jensen et Kurtz, 1997 ; Guan et coll, 1997 ; Smith et Bell, 1978 ; Cheng et coll, 1999 ; Wang et coll, 1998 ; Hartner et coll, 1998 ; Tomasoni et coll, 1998). COX-2 est largement exprimée de façon constitutive dans le rein au niveau des vaisseaux, du glomérule, des segments tubulaires et de l'interstice.

Plusieurs essais cliniques contrôlés, comparant les effets d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 à des AINS classiques, ont confirmé l'importance de l'isoforme inductible de COX au niveau du rein. L'analyse globale des études cliniques avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2 a permis de mettre en évidence le rôle important de COX-1 dans le maintien de la fonction rénale alors que COX-2 est impliquée dans la régulation physiologique de la réabsorption de sodium (Brater et coll, 2001).

1.4.4.e. Système reproducteur

C'est grâce à la présence des PGs en quantité abondante dans le liquide séminal qu'elles ont été découvertes. Cependant, leur rôle physiologique chez l'homme n'a toujours pas été élucidé. Elles sont, en revanche, très impliquées dans toutes les phases de l'activité génitale chez la femme. Les PGE₂ et F_{2α} interviennent au cours de l'ovulation, la menstruation, la lutéolyse et contrôlent le transport de l'ovule vers l'utérus et stimulent la musculature utérine (O'Brien, 1995), d'où leurs propriétés ocytociques. Ces propriétés sont mises à profit en obstétrique, soit pour déclencher le travail par administration d'analogue de PGE₂ à faible concentration, soit dans le cadre d'une interruption volontaire de grossesse par une injection à forte concentration ou par une application locale d'analogue synthétique de PGE₁ (Escousse, 1996).

1.4.4.f. Tube digestif

Les PGs ont été identifiées, à des concentrations variables, dans tous les segments du tractus digestif. C'est l'estomac, principalement l'antra, région non-glandulaire, qui possède la plus forte capacité de synthèse des PGs (Eberhardt et Dubois, 1995). Les PGs sont impliquées dans la motricité digestive. Les effets myorelaxants des PGE₁, E₂ et I₂ permettent de diminuer la pression du sphincter antérieur de l'œsophage et d'inhiber les contractions antrales spontanées ou provoquées. Au contraire, les PGF_{2α} induisent la contraction des muscles du sphincter et de l'estomac.

Les PGs interviennent également de façon importante dans les mécanismes de sécrétion digestive et de cytoprotection des muqueuses (Robert et coll, 1979 ; Wallace, 1997). Elles stimulent, d'une part, au niveau gastrique, la production du mucus et la sécrétion hydrocarbonatée qui auront pour conséquence de limiter la rétrodiffusion des ions H⁺ vers les cellules pariétales. Et d'autre part, elles maintiennent le flux sanguin sous-muqueux qui entretient une activité métabolique importante et nécessaire au renouvellement des cellules de la paroi digestive. Enfin, elles réduisent les taux d'AMPc dans les cellules pariétales et réduisent ainsi, la sécrétion d'acide gastrique induite par la gastrine ou l'histamine (Wilson et Kaymakcalan, 1981 ; Johansson et Bergstrom, 1982).

Dans la plupart des espèces, incluant l'Homme, les PGs protectrices sont synthétisées massivement par COX-1, même si COX-2 est également exprimée dans la muqueuse gastrique normale de l'Homme ou du rat (Kargman et coll, 1996). Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, les souris déficientes pour COX-1 n'ont pas développé spontanément des saignements et des érosions de la muqueuse gastrique (Langenbach et coll, 1995). Il existe sûrement d'autres mécanismes de cytoprotection, par exemple avec le NO, qui permettent de parer à l'absence de synthèse des PGs.

Les PGs produites par COX-1 permettent la protection des cellules épithéliales des cryptes de Lieberkühn dans l'iléon de souris irradiées. COX-1, dans des conditions physiologiques, participe à la synthèse des PGs. Elle a été localisée au niveau de la zone apicale des cellules à mucus (Iseki, 1995) et dans les cellules épithéliales régénératrices. Cette localisation supporte l'hypothèse du rôle de COX-1 dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastrique.

La PGI₂ et la PGE₁, lorsqu'elles sont produites principalement par COX-1, assurent un rôle cytoprotecteur au niveau de la muqueuse stomacale en inhibant la production d'acide gastrique par les cellules pariétales, en stimulant leur sécrétion de bicarbonates et de mucus et en maintenant le flux sanguin au niveau de l'endothélium sous muqueux. Enfin, elles permettent une réparation rapide de l'épithélium grâce à un processus impliquant la migration de cellules basales, la synthèse d'ARN et de protéines (Dubois et coll, 1998). Ces fonctions sont à la base de la cytoprotection par des analogues synthétiques de la PGE₁ (misoprostol®) lors des traitements par AINS chez des patients présentant des risques majeurs de complications digestives graves (âge > 65 ans, antécédents d'ulcères gastro-duodénaux, ...).

L'induction de COX-2 a été mise en évidence dans les ulcérations gastriques de souris (Mizuno et coll, 1997). L'expression de COX-2 est corrélée à une augmentation de la production de PGs. Seule l'expression de COX-2 est augmentée dans les macrophages, les myofibroblastes et les cellules endothéliales en bordure des ulcérations. Par contre, les deux isoformes sont induites par *H pylori* et COX-1 contribue plus que COX-2 à la synthèse des PGE₂ (Jackson et coll, 2000). Ces résultats vont à l'encontre des observations faites sur la perte des effets protecteurs des inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans le cas des infections par *H pylori* (Laine et coll, 1999). L'expression de COX-2 a également été mise en évidence dans la muqueuse gastrique de rat dans laquelle des ulcérations ont été induites de façon expérimentale (acide acétique), alors que l'expression de COX-1 n'est pas modifiée, ni par l'ulcération, ni par la cicatrisation (Shigeta et coll, 1998 ; Schmassmann et coll, 1998). L'expression de COX-2 a été montrée dans le cytoplasme de différents types cellulaires localisés (monocytes, macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales) dans les régions d'activité de réparation maximale. Étant donné que les PGs agissent à courte distance, l'inhibition de la synthèse des PGs par COX-2 peut retarder la réparation. L'inhibition sélective de COX-2 par le NS-398 (inhibiteur sélectif de COX-2, 100 mg/kg) (Lesch et coll, 1998) a montré le ralentissement du processus de cicatrisation. D'autre part, l'expression de COX-1 et de COX-2 a été montrée dans les cellules HuGE, cellules gastriques endothéliales humaines, *in vitro* (Hull et coll, 1999). L'induction de l'expression de COX-2 est associée à l'angiogenèse par les mêmes cellules dans deux modèles *in vitro*. L'inhibition sélective de COX-2 par le L-745,337, retarde la cicatrisation d'ulcère gastrique induite expérimentalement chez le rat. Dans le même modèle, les mêmes effets ont été constatés avec les inhibiteurs non sélectifs, indométacine et diclofénac (Ferraz et coll, 1997).

Tous ces éléments ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de COX-2 dans la cicatrisation des ulcères gastriques, en montrant son rôle dans la maturation de l'ulcère et dans l'angiogenèse, événements déterminants dans le processus de cicatrisation. Cependant, le rôle de COX-1 dans la régénération de la muqueuse, tout comme dans l'angiogenèse, n'est pas à exclure.

1.4.4.g. Inflammation

Les PGs participent au développement des signes et des symptômes de l'inflammation (Ferreira et coll, 1974), où elles interviennent comme un modulateur plutôt que comme un médiateur. Leurs effets pro-inflammatoires sont de 3 types.

• **Signes cardinaux de l'inflammation**

Les effets vasodilatateurs des PGE₂, I₂ et D₂ interviennent au niveau des artérioles et des veinules, provoquant le développement de la rougeur du tissu atteint (*rubor*). L'œdème (*tumor*) apparaît simultanément par l'action synergique des PGs avec d'autres agents vasoactifs, comme la sérotonine, les kinines et la substance P. De plus, la chaleur locale (*calor*) pourrait relever majoritairement de l'afflux sanguin sur le site de l'inflammation et par conséquent de l'effet vasodilatateur des PGs (Belch, 1989). Enfin, la douleur (*dolor*) perçue lors d'une inflammation périphérique est également dépendante des PGs. En effet, même si les PGs sont peu algogènes, elles jouent un rôle essentiel dans la perception de la douleur, puisqu'elles potentialisent la sensation douloureuse en abaissant le seuil d'excitabilité des nocicepteurs périphériques aux substances algogènes endogènes, comme la substance P, l'histamine ou la bradykinine. Une étude récente (Ajuebor et coll, 2000) a montré le rôle des PGE₂ et du PGI₂ dans la réaction inflammatoire, en induisant notamment la formation des œdèmes grâce à leurs effets vasodilatateurs et leur rôle dans la douleur, en agissant sur les terminaisons nerveuses. Au niveau central, les PGs peuvent également potentialiser la transmission de l'information nociceptive. Elles n'interviennent pas dans la transmission de la douleur aiguë, mais agissent lors de douleurs persistantes, comme celle survenant avec une inflammation périphérique. En effet, sous l'action de stimuli répétés, les PGs sont libérées par les neurones post-synaptiques, puis en se fixant sur des récepteurs au niveau des neurones pré-synaptiques, elles facilitent la libération des neurotransmetteurs (Yaksh, 1999).

Néanmoins, les PGF_{2α} peuvent diminuer les effets hyperalgiques des PGE₂ et l'effet antalgique de la β-endorphine pourrait s'expliquer, au moins en partie, par l'inhibition qu'elle exerce sur la biosynthèse des PGs.

• **Action sur les polynucléaires neutrophiles**

Les PGI₂, E₁ et E₂ induisent l'augmentation de l'AMPC intracellulaire dans les polynucléaires neutrophiles. Ceci conduit à la réduction de la libération des enzymes lysosomiales, à la réduction du chimiotactisme et de la diapédèse. Au contraire, les PGF_{2α} induiraient une augmentation du chimiotactisme en augmentant le taux intra-cellulaire de GMPc.

• **Action sur les lymphocytes**

Comme pour les polynucléaires neutrophiles, les PGE₁, E₂ et I₂ ont un effet inhibiteur sur les fonctions lymphocytaires. En effet, il a été montré *in vitro* que les PGE₂ et la PGI₂ inhibent la prolifération lymphocytaire en augmentant les taux d'AMPC intra-cellulaires. *In vivo*, ces PGs inhibent les réponses médiées par les lymphocytes. A l'inverse, les PGF_{2α} activent expérimentalement la prolifération des lymphocytes grâce à l'augmentation du GMPc intra-cellulaire. Par contre, des résultats opposés ont été rapportés pour la production d'immunoglobulines et la fonction lymphocytaire T-suppressive (Belch, 1989).

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de COX-2 dans l'inflammation, qui est devenue la cible des futurs traitements des arthropathies inflammatoires (Gilroy and Colville-Nash, 2000). Certaines de ces études ont montré la présence de COX-2 aussi bien dans des modèles d'inflammation aiguë (œdème à la carragénine) (Tomlinson et coll, 1994) que

chronique (Appleton et coll, 1995 ; Vane et coll, 1994) et ont décrit sa distribution spatiale et temporelle. En effet, ces expériences ont montré que l'activité de l'enzyme augmentait au cours du développement de l'inflammation et ont pu mesurer l'augmentation de la production de ses métabolites, les PGE₂. L'inhibition de l'expression de COX-2 par les glucocorticoïdes et les cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-4) (Masferrer et coll, 1990 ; Mertz et coll, 1994 ; Dworski et Sheller, 1997) a mis en évidence le rôle de cette isoforme dans l'inflammation.

Même si l'efficacité des inhibiteurs sélectifs de COX-2 n'est plus à démontrer, il est important de considérer qu'elle n'a été montrée, au cours de l'inflammation, qu'à des doses inhibant aussi COX-1 (Wallace et coll, 1998).

Chez l'Homme, l'expression de COX-2 a été montrée dans la membrane synoviale au cours de la polyarthrite rhumatoïde, la production de PGs semblant participer au processus inflammatoire dans la synoviale (Siegle et coll, 1998). COX-2 est induite au cours des inflammations exudatives aiguës, de la formation de granulome et de la résorption osseuse. La polyarthrite rhumatoïde est caractérisée par une réponse exudative, la formation d'un granulome ou la formation d'un pannus et la résorption osseuse.

L'administration de LPS à des volontaires sains a permis de montrer que même si COX-2 est prédominante, COX-1 est exprimée au cours de la réaction inflammatoire suivant l'injection de LPS (McAdam et coll, 2000). Dans ce modèle, l'activation des COXs contribue à la peroxydation lipidique induite par le LPS. De plus, seule COX-2 contribue à la réponse constitutionnelle au LPS chez l'homme.

Le PPAR γ est exprimé dans les macrophages et dans les synoviocytes de patients arthritiques, et ses ligands inhibent la croissance des synoviocytes *in vitro* en induisant l'apoptose. De plus, le 15d-PGJ₂, métabolite du PGD₂, a des potentialités 100 fois supérieures pour inhiber l'inflammation chronique et la formation du pannus dans la polyarthrite rhumatoïde que la troglitazone (Kawashito et coll, 2000). De même, il est 5 à 30 fois plus efficace que cette dernière, pour induire l'apoptose dans les synoviocytes et dans l'endothélium et pour inhiber la production des cytokines par les macrophages.

Le 15d-PGJ₂ est capable de supprimer la synthèse des PGE₂ induite par l'IL-1 β dans les synoviocytes arthritiques, en inhibant l'expression de la PLA₂ cytosolique ou l'expression de COX-2 (Tsubouchi et coll, 2001), alors que la troglitazone et les autres prostanoïdes, tels que les PGE₂, le PGF_{2 α} , le PGA₁ et le PGD₂ n'ont aucun effet. L'inhibition de COX-2 par le 15d-PGJ₂ a également été montrée dans d'autres types cellulaires, dont les macrophages murins et les hépatocytes fœtaux (Inoue et coll, 2000 ; Castrillo et coll, 2000 ; Callejas et coll, 1999). La troglitazone, contrairement au 15d-PGJ₂, peut inhiber l'expression de la 5-LOX dans les mêmes conditions. Ces résultats suggèrent que l'effet anti-inflammatoire du 15d-PGJ₂ est indépendant du PPAR γ , même si dans les macrophages U937 stimulés par du LPS, COX-2 est régulée par un rétrocontrôle négatif impliquant le PPAR γ et si le contrôle négatif exercé par les PGs sur la voie de transformation de l'AA est spécifique du 15d-PGJ₂. Il a également été montré que les PGE₂ et le PGF_{2 α} étaient capables d'inhiber l'expression de COX-2 ainsi que la synthèse de PGE₂ dans les macrophages (Pang et coll, 1997). Le rétrocontrôle de la voie de biotransformation de l'AA est dépendant du type cellulaire.

Le 15d-PGJ₂, comme les AINS (aspirine, salicylés ou indométacine) (Yin et coll, 1998), est un inhibiteur de la kinase I κ B (IKK- β), conduisant donc à l'inactivation de NF- κ B, responsable de l'activation de COX-2 (Newton et coll, 1997), expliquant que les effets du 15d-PGJ₂ sont indépendants du PPAR γ (Rossi et coll, 2000). Cependant, les AINS comme l'indométacine, l'ibuprofène ou le fénamate, peuvent aussi être des ligands du PPAR γ et ainsi bloquer la synthèse des cytokines inflammatoires par les monocytes humains (Jiang et coll, 1998).

On a pu évaluer que pour inhiber 50% de l'inflammation avec une molécule comme le SC-58125, un inhibiteur sélectif de COX-2, il faut des doses 100 fois plus importantes que celles requises pour inhiber COX-1. Ceci a soulevé l'hypothèse que les doses nécessaires pour observer un effet anti-inflammatoire significatif correspondent à celles où la sélectivité d'inhibition des molécules est perdue (Wallace et coll, 1998). Ainsi, certains des effets gastro-intestinaux sont accentués.

L'implication de COX-1 au cours du processus inflammatoire a été étudiée. La réduction de l'inflammation de la patte chez le rat implique la suppression systémique de COX-1, puisque dans cette étude, les molécules inhibitrices de COX-2 ne sont efficaces qu'à des doses permettant l'inhibition de COX-1 et accentuant les effets gastro-intestinaux (Wallace et coll, 1998). Ces résultats chez le rat ont été complétés par une étude chez des souris déficientes pour le gène de COX-2, où le rôle de COX-1 a été mis en évidence au cours d'une inflammation aiguë consécutive à l'injection de carragénine.

La surproduction de certaines PGs au cours de processus inflammatoires n'est pas forcément synonyme d'effets délétères. Les colites ulcéreuses actives produisent des taux élevés de PGs (Gould et coll, 1977 ; Harris et coll, 1978 ; Sharon et coll, 1978). L'augmentation de PGs accompagnant l'inflammation colique pourrait être bénéfique, en assistant à la protection de la muqueuse contre les lésions et/ou en induisant la réparation. Cette affirmation est supportée par 3 constatations : i) les AINS qui inhibent la synthèse des PGs, augmentent les risques de maladies inflammatoires ou réactivent les maladies inflammatoires quiescentes (Kaufmann et coll, 1987 ; Rampton et coll, 1983) ; ii) les AINS aggravent la colite expérimentale (Reuter et coll, 1996 ; Wallace et coll, 1992), mais des composés identiques d'un point de vue structural, n'inhibant pas la synthèse des PGs, sont sans effet (Reuter et coll, 1996) ; et iii) une administration intra-colonique de PGE₂ ou d'analogues de PGE₂ réduit la sévérité de colites expérimentales (Allgayer et coll, 1989 ; Fedorak et coll, 1990 ; Wallace et coll, 1985). Il a été montré que les PGs produites par le colon inflammatoire sont synthétisées par COX-2 chez le rat (Reuter et coll, 1996) et chez l'homme (McCartney et coll, 1999). Par ailleurs, les PGD₂ majoritairement produites par les cellules mastocytaires de la muqueuse ou par les entérocytes en culture (Longo et coll, 1998), sont synthétisées par COX-2 et sont capables de supprimer les infiltrations de leucocytes dans la cavité pleurale inflammée de rat (Gilroy et coll, 1999). Certaines PGs et d'autres membres de cette famille de médiateurs lipidiques peuvent exercer des effets anti-inflammatoires. Elles peuvent inhiber l'adhésion des leucocytes (Asako et coll, 1992), inhiber la libération des espèces activées de l'oxygène par les neutrophiles (Wound et Freund, 1981), empêcher la dégranulation des mastocytes (Hogaboam et coll, 1993), ou

encore inhiber la synthèse d'un certain nombre de médiateurs de l'inflammation et de cytokines par différentes cellules (Ham et coll, 1983 ; Hogaboam et coll, 1993 ; Kunkel et coll, 1986). De plus, les propriétés anti-inflammatoires du PGD_2 ont été montrées dans un modèle expérimental de pleurésie (Gilroy et coll, 1999).

Dans ce cas, les AINS et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 seraient capables d'exacerber la réponse inflammatoire et les lésions tissulaires. Les taux de PGD_2 ne sont élevés qu'au cours des stades précoces suivants l'induction de la colite (1-3 h). La synthèse des PGD_2 modifie celle des PGE_2 , tout comme l'infiltration des granulocytes. En effet, les PGD_2 exogènes inhibent l'infiltration des granulocytes dans le colon. L'inhibition sélective de COX-2 avec le célécoxib bloque complètement l'augmentation de synthèse de PGD_2 dans le colon, provoquant le doublement de l'infiltration granulocytaire. Ainsi, les PGD_2 dérivés de COX-2 constituent un signal important dans les stades précoces de la colite. Leur activité anti-inflammatoire est médiée par le récepteur DP des PGs (Ajuebor et coll, 2000).

Dans le colon, les PGE_2 augmentent la réponse de lignées cellulaires épithéliales (T84) à l'histamine et au cabachol. Elles sont secrétées par les myofibroblastes sub-épithéliaux intestinaux stimulés par l' $\text{IL-1}\alpha$. Les PGs peuvent moduler la prolifération des cellules épithéliales intestinales et leur survie *in vitro*. Elles peuvent également en moduler les sécrétions et la réplication (Takafuji et coll, 2000). Les PGE_2 peuvent créer un effet « barrière de protection » dans l'épithélium du colon. Cet effet est de longue durée (heures) et peut être préservé face aux effets de certaines cytokines. Là encore, cet effet pourrait expliquer les effets négatifs des inhibiteurs de COX au cours d'inflammation chronique du colon. Les récepteurs EP_2 et EP_3 aux prostanoïdes sont exprimés de façon exclusive dans les cellules épithéliales à l'apex des cryptes. Dans la muqueuse inflammée, l'expression des récepteurs s'étend sur la surface latérale des cryptes. Ceci permet l'extension de la barrière protectrice.

1.4.4.h. Effet sur le cartilage

L'homéostasie du cartilage implique la synthèse de macromolécules de la matrice extracellulaire (protéoglycanes et collagène), et la régulation des enzymes qui dégradent cette matrice, comme les métalloprotéases (MMP). Les chondrocytes, seul type cellulaire présent dans le cartilage, produisent différents prostanoïdes, comme PGE_2 , PGI_2 et PGF_2 . La contribution des PGs à l'homéostasie du cartilage est encore mal connue et controversée, puisque des effets aussi bien anaboliques que cataboliques ont été observés. Certains travaux expérimentaux montrent que les PGs sont capables d'inhiber la synthèse des kératanes sulfates (Fukuda et coll, 1995), des aggrécanes (Fulkerson et Damiano, 1983 ; Mitrovic et coll, 1981) et des collagènes (O'Keefe et coll, 1992). Elles seraient également capables de moduler l'équilibre entre les protéinases matricielles (MMPs) et leurs inhibiteurs (Yamada et coll, 1996) et de réduire la prolifération des chondrocytes (Blanco et Lotz, 1995 ; Steinberg et coll, 1991 ; Verbruggen et coll, 1992), ce qui les rendraient responsables d'effets délétères sur le cartilage.

A l'inverse, d'autres travaux ont montré qu'elles étaient capables d'inhiber l'expression des MMPs (Steinberg et Sledge, 1991 ; DiBattista et coll, 1994) et qu'elles pourraient stimuler la prolifération et la différenciation des chondrocytes, la synthèse des protéoglycanes et des collagènes (DiBattista et coll, 1996 ; Schwartz et coll, 1998 ; Blanco et coll, 1995 ; Dingle,

1991 ; O'Keefe et coll, 1992), qu'elles augmenteraient le taux de récepteur aux glucocorticoïdes et seraient les médiateurs de la vitamine D (DiBattista et coll, 1991). Ceci serait en faveur de leur effet bénéfique sur le cartilage.

La synthèse de ces prostanoides par le cartilage peut être augmentée par des facteurs biologiques comme l'IL-1, le TNF α ou un traumatisme (Campbell et coll, 1990 ; Malesud et coll, 1981). L'IL-1 induit la dégradation de cartilage humain *in vitro* et plusieurs travaux ont suggéré que les PGE₂ pourraient intervenir dans la médiation des effets de l'IL-1 sur le cartilage (Chin et coll, 1988). Les chondrocytes humains non stimulés ne contiennent pas d'ARN messager de COX-2, à un taux détectable, mais il est induit par l'IL-1 β (Geng et coll, 1995). Dans les chondrocytes articulaires de lapin, l'ARNm de COX-2 est exprimé de façon constitutive, et son expression est augmentée dans des cultures stimulées par l'IL-1. L'ARNm de COX-1 n'est pas détecté dans des cultures traitées ou non à l'IL-1 (Lyons-Giordano et coll, 1993) dans les chondrocytes bovins et dans les ostéoblastes humains (De Brum-Fernandes et coll, 1994 ; Morisset et coll, 1998).

Le cartilage est le site de la destruction de la matrice extra-cellulaire dans les arthropathies inflammatoires et des processus pathogéniques de l'arthrose. Les chondrocytes sont la source, avec les synoviocytes de la membrane synoviale, de l'augmentation de synthèse de PGs dans l'arthrite (Wittenberg et coll, 1993 ; Salmon et coll, 1983).

Les PGs sont produits à des taux élevés dans les tissus inflammatoires, comme la membrane synoviale arthritique (Bombardier et coll, 1981 ; Davies et coll, 1984). Les PGE₁ et les PGE₂ contribuent à l'inflammation de la membrane synoviale en augmentant le flux sanguin local et en potentialisant les effets d'autres médiateurs comme la bradykinine et l'IL-1 β qui induit la vasoperméabilité. Les PGE₂ contribuent également à la destruction osseuse au cours de la polyarthrite rhumatoïde, en participant à la résorption des ostéoclastes (Robinson et coll, 1975). Ces observations suggèrent donc que les PGE₂ participent à la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde.

Différentes études ont montré que les PGE₂ pouvaient avoir un rôle différent dans le cartilage sain et arthrosique (Amin et coll, 1997). Des échantillons de cartilage prélevés chez des patients arthrosiques libèrent spontanément des PGE₂ *ex vivo* après 48 heures de culture à des taux 50 fois supérieurs à la normale et 18 fois supérieurs à du cartilage sain traité par des cytokines et des endotoxines. Cette augmentation de synthèse des PGE₂ coïncide avec l'induction de COX-2 dans le cartilage arthrosique. La production de NO et de PGE₂ par les explants de cartilage arthrosique est régulée au niveau transcriptionnel et traductionnel. La DEX inhibe la production spontanée de PGE₂, mais pas celle de NO. L'inhibition de la NOS réduit de 90% la production de NO, mais augmente (de deux fois) la production de PGE₂ dans ces mêmes explants. De même, l'addition de donneurs de NO exogènes inhibe la production de PGE₂. Cette production est augmentée dans les mêmes explants stimulés par des cytokines et des endotoxines. Ces résultats ont mis en évidence la production des PGE₂ par COX-2 dans les explants de cartilage arthrosique *ex vivo* et la libération spontanée de NO qui agit de manière autocrine sur les cellules pour atténuer la production de PGE₂ par COX-2.

Les PGE₂ jouent également un rôle important dans l'angiogénèse de la membrane synoviale par l'expression de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Ben-Av et coll, 1995), par la synthèse de médiateur de l'inflammation de la synoviale ou de l'érosion de l'articulation.

Les inhibiteurs de COX sont largement utilisés dans le traitement des arthropathies inflammatoires et représentent la principale intervention pharmacologique dans l'arthrose (Hochberg et coll, 1995 ; Brandt et coll, 1987). Les effets des anti-inflammatoires stéroïdiens ou non, dans le cartilage restent cependant controversés (Brandt, 1987 ; Pelletier et coll, 1993). Les travaux de Blanco se sont intéressés aux effets de différents anti-inflammatoires sur l'activité des COXs dans le cartilage articulaire humain pour différentes raisons : i) l'expression et la modulation de COX-1 et de COX-2 varient selon le type cellulaire considéré ; ii) la sélectivité d'inhibition des isoformes de COX par les molécules anti-inflammatoires n'est pas identique dans toutes les espèces, les tissus et les cellules ; iii) les AINS constituent le traitement principal des pathologies inflammatoires et la voie pharmacologique majeure d'intervention dans l'arthrose (Blanco et coll, 1999).

1.4.4.i. Mort cellulaire programmée ou apoptose

Depuis plusieurs années, l'apoptose, ou mort programmée des cellules, apparaît être l'un des phénomènes importants dans la croissance et le développement mais aussi dans le maintien du nombre approprié de cellules dans un organisme pluricellulaire adulte. Le mécanisme moléculaire conduisant à la mort de la cellule est schématisé Figure 17.

Les PGH₂ synthétisées par COX-1 et COX-2 sont isomérisées en PGs dont les propriétés proapoptotiques ont été mises en évidence dans les lymphocytes. Les PGE₂ induisent l'apoptose dans les lymphocytes de manière directe ou indirecte (Mastino et coll, 1992 ; Brown et coll, 1992). Les PGs sont aussi impliquées dans la mort programmée des cellules épithéliales de la membrane basale de l'utérus pendant la nidation et à la surface du follicule pré-ovulatoire (Abrahamsohn et coll, 1993 ; Ackerman et Murdoch, 1993). Le rôle des COXs dans ces deux cas est d'initier la synthèse des PGs qui, en agissant vraisemblablement de façon paracrine induisent la transduction du signal apoptotique au travers de leurs récepteurs membranaires respectifs. Les PGA₂ et 15d-PGJ₂ sont également capables d'induire l'apoptose dans les lymphocytes mais ces PGs ne possédant aucun récepteur membranaire, agissent probablement sur des cibles intracellulaires par l'intermédiaire, par exemple, du facteur de transcription PPAR (Kim et coll, 1993 ; Forman et coll, 1995).

Les changements observés au niveau du cartilage articulaire au cours du vieillissement correspondent à une réduction de la cellularité et à une calcification de la matrice extracellulaire. Ces modifications augmentent les risques d'arthrose. L'apoptose est un événement cellulaire important qui permet le maintien, le remodelage ou le renouvellement du cartilage mature. Cependant, des travaux récents ont montré que l'apoptose était impliquée dans les processus de dégradation au cours de l'arthrose et associés à l'âge (Horton et coll, 1998 ; Blanco et coll, 1998 ; Hashimoto et coll, 1998). De cette manière, l'apoptose chondrocytaire serait impliquée dans la déplétion en protéoglycanes (Hashimoto et coll, 1998) ou dans la calcification pathologique de la matrice (Lee et coll, 2000). D'autres travaux

(Nishida et coll, 2001) ont montré que l'apoptose participait à la formation des ostéophytes dans le cartilage arthrosique humain.

L'induction de l'apoptose fait intervenir des interactions entre des facteurs pro- et anti-apoptotiques de la famille de gène Bcl-2, notamment le rapport d'expression Bax et Bcl-x qui contrôle l'activation des caspases et par conséquent la mort cellulaire. L'activation de la caspase-3 est nécessaire à l'exécution de la mort cellulaire par apoptose dans un certain nombre de cellules, dont les chondrocytes (Lee et coll, 2000 ; Pelletier et coll, 2000). Des travaux ont montré que la réduction de l'expression de Bcl-2 dans les chondrocytes pourrait être un marqueur de la mort programmée des cellules au cours de l'arthrose (Pelletier et coll, 2000 ; Feng et coll, 1998). De plus, il semble que les PGE₂ jouent un rôle dans l'induction de l'apoptose chondrocytaire (Miwa et coll, 2000), suggérant un rôle possible des AINS dans la chondroprotection. Des travaux récents (Mukherjee et coll, 2001) étudiant l'apoptose induite par la staurosporine sur des chondrocytes immortalisés ont confirmé que l'expression de Bcl-2 était altérée au cours de l'apoptose et que celle de la caspase-3 était induite. Deux des AINS testés, nimésulide (inhibiteur préférentiel de COX-2) et ibuprofène (inhibiteur non sélectif), se sont avérés capables de bloquer l'activation de la caspase-3 et de l'apoptose. Par contre, l'inhibiteur sélectif de COX-2, NS-398, a été sans effet sur ces deux paramètres. Ceci suggère que les AINS ont une activité protectrice sur les chondrocytes, mais que cette activité est différente de l'inhibition de COX-2.

Par ailleurs, il existe plusieurs preuves de l'implication du NO dans l'apoptose chondrocytaire et dans la dégénérescence du cartilage articulaire au cours de l'arthrose. Le NO peut induire des cassures de l'ADN, la modification des lipides et des protéines ou encore induire l'apoptose chondrocytaire. De plus, le NO influence la synthèse de collagènes et de protéoglycanes par les chondrocytes, interfère avec leur migration et leur attachement à la fibronectine (Clancy et coll, 1998). Il a également été montré que le NO était largement exprimé dans le liquide synovial, le cartilage et la membrane synoviale de patients arthritiques et que le chondrocyte en était sûrement la principale source (Maier et coll, 1994 ; Sakurai et coll, 1995). La iNOS, enzyme responsable de la synthèse du NO, présente dans les chondrocytes arthrosiques, est induite en réponse à des stimulations par les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-17 ou le TNF α . Par contre, la production de NO peut être inhibée par le TGF β , l'IL-4 ou l'IL-10 (Lotz, 1999 ; Martel-Pelletier, 1998 ; Amin et Abramson, 1998 ; Blanco et coll, 1995 ; Sasaki et coll, 1998).

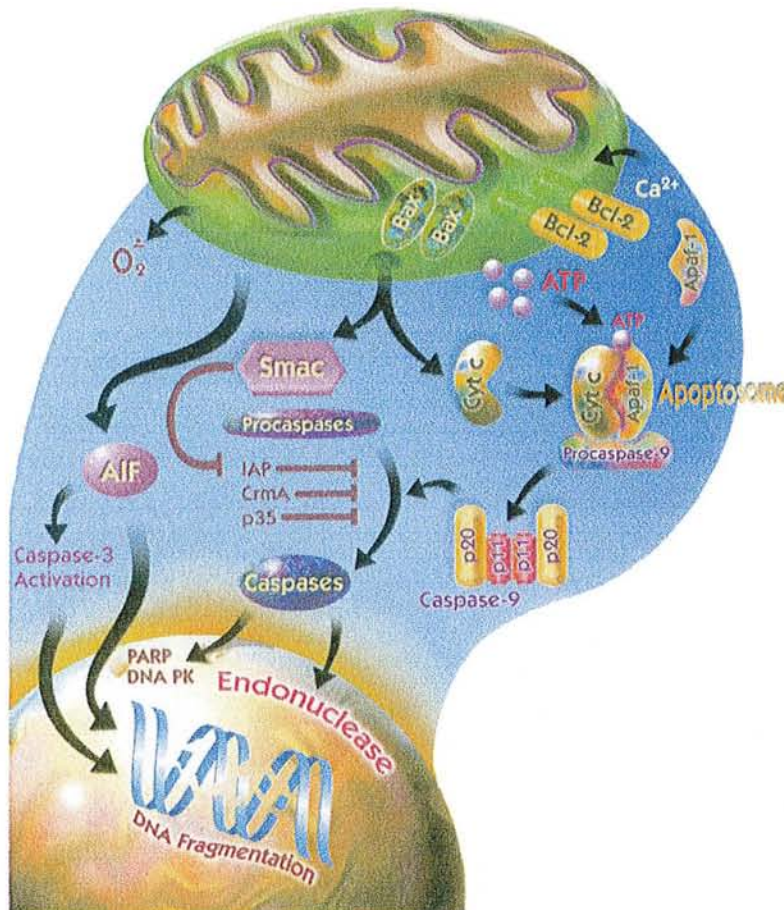


Figure 17 Représentation schématique des principaux mécanismes moléculaires du processus apoptotique, impliquant Bax, Bcl-2, les caspases initiatrices et effectrices et l'AIF (« apoptosis inducing factor »)

1.4.4.j. Cancer

COX-2 est impliquée dans le processus de cancérisation (Eberhardt et coll, 1994), notamment dans celui du cancer colorectal (Sano et coll, 1995 ; Dimberg et coll, 1999 ; Hao et coll, 1999 ; Chapple et coll, 2000), dans le cancer de la prostate (Gupta et coll, 2000), du sein, de l'estomac (Ristimäki et coll, 1997 ; Uefuji et coll, 1998 ; Lim et coll, 2000), du pancréas (Yip-Schneider et coll, 2000), des poumons (Ochiai et coll, 1999), de la tête et du cou (Chan et coll, 1999).

Expérimentalement, la taille et la fréquence des polypes intestinaux sont considérablement réduites chez des souris déficientes pour les gènes de la polyadénomatoase rectocolique familiale et de COX-2 (Oshima et coll, 1996). De plus, l'inhibition sélective de COX-2 conduit à la suppression du cancer colorectal induit expérimentalement (Kawamori et coll, 1998), tout comme chez les rats traités par des agents cancérogènes ou dans des lignées de cellules cancéreuses en culture (Reddy et coll, 1996 ; Qiao et coll, 1998 ; Crew et coll, 2000). Dans le carcinome hépatocellulaire, le niveau d'expression de COX-2 a été corrélé avec le stade de différenciation, suggérant que l'expression anormale de COX-2 est impliquée dans le processus de cancérisation au niveau hépatique (Koga et coll, 1999 ; Shiota et coll, 1999).

Une étude récente (Bae et coll, 2001) a confirmé le rôle déterminant joué par COX-2 dans le processus de différenciation de l'hépatocarcinome puisque son inhibition induit la suppression de la croissance des cellules, par l'induction de l'apoptose. Qui plus est, l'expression de l'ARNm de COX-2 a été corrélée avec la profondeur de l'invasion dans des tissus de cancer de l'estomac (Ohno et coll, 2001).

Le NO pourrait également être associé à COX-2 au cours du processus de cancérisation puisqu'il a été montré que l'activité de COX-2 est augmentée par le NO produit par la iNOS (Nogawa et coll, 1998). L'expression simultanée et augmentée de iNOS et de COX-2 a été observée dans deux formes de cancer de l'œsophage, dans un carcinome hépatocellulaire (Rahnan et coll, 2001), tout comme au cours des gastrites induites par *H. pylori* (Wilson et coll, 1998 ; Fu et coll, 1999). COX-2 et iNOS sont impliquées dans le processus de cancérisation de façon directe ou par l'intermédiaire de la synthèse de médiateur qui régulent la croissance cellulaire (Tsujii et Dubois, 1998 ; Jaiswal et coll, 2000). Ces effets peuvent notamment être liés à la synthèse de peroxy-nitrite ou de prostanoïdes.

Trois eicosanoïdes formés à partir de l'AA apparaissent jouer un rôle clé dans le cancer de la prostate : les PGE₂, le 12-HETE et le 5-HETE (Myers et coll, 2001). Les cellules de cancer de la prostate produisent des PGE₂ dans des cultures de tissu. Les tissus prélevés au moment de l'ablation de la prostate montrent une production de PGE₂ 10 fois supérieure dans les tissus cancéreux de la prostate par rapport aux tissus périphériques (Chaudry et coll, 1994). Les deux isoformes de la COX ont été identifiées dans la prostate, mais seule COX-2 est sélectivement surexprimée dans le tissu cancéreux (Gupta et coll, 2000). La production de PGE₂ dépendante de COX-2 pourrait contribuer au développement du cancer de la prostate de différentes façons et en favoriser la progression (Sawaoka et coll, 1999 ; Tsujii et coll, 1998). Le rôle de COX-2 dans l'angiogenèse est maintenant clairement établi, et favorise ainsi la croissance des tumeurs, l'invasion et la formation des métastases. De plus, l'inhibition de COX-2 *in vitro* conduit à l'apoptose, ce qui suggère que les produits de COX-2 contribuent à la survie des cellules cancéreuses de la prostate humaine (Liu et coll, 1998). Les PGE₂ peuvent induire l'apoptose dans les cellules NT (« natural killer ») et dans les cellules T cytotoxiques (Rhind et coll, 2000). La surexpression de COX-2 dans certains cancers est la résultante de la modulation de certaines voies de signalisation. L'implication de p53 dans la régulation de l'expression du gène de COX-2 peut expliquer en partie l'augmentation de COX-2 notée dans différentes formes de cancer contenant le mutant p53 (Kutchera et coll, 1996 ; Eberhardt et coll, 1994 ; Kargmann et coll, 1995 ; Sano et coll, 1995 ; Hwang et coll, 1998 ; Zimmermann et coll, 1999). D'autre part, plusieurs travaux ont montré que le potentiel cancérigène lié à la surexpression de COX-2 était souvent associé à la résistance à l'apoptose (Tsujii et Dubois, 1995). L'activation de p38 et de ERK (kinase régulée par des signaux extracellulaires), appartenant à la famille des kinases activées par un mitogène (MAPK) ainsi que celle de COX-2 a été montrée dans l'épithélium de colon humain soumis à un changement d'osmolarité (équivalent à un stress environnemental subi par les cellules) (Arbadi et coll, 2001). De plus, dans ces conditions, l'inhibition de p38 réduit de 50% l'expression de COX-2. Ce mécanisme pourrait aider à expliquer le mécanisme de pathogénèse du carcinome du

colon. D'autres travaux (Liu et coll, 2001) ont montré que l'incidence des hyperplasies de la glande mammaire, des dysplasies et des transformations en tumeurs métastatiques est augmentée de façon considérable chez les souris modifiées (souris transgéniques ayant le gène de COX-2 humaine) ayant eu plusieurs grossesses. Les tissus tumoraux (glandes mammaires) expriment COX-2 et ont des taux réduits en protéines pro-apoptotiques (Bax et Bcl-x_L) et des taux augmentés en protéine anti-apoptotiques (Bcl-2). Ces résultats montrent que l'expression de COX-2 est suffisante pour induire la cancérisation de la glande mammaire. Un mécanisme par lequel la COX pourrait être impliquée dans l'initiation de la formation des tumeurs est la co-oxygénation de l'ADN et des nucléosides pendant la réaction catalysée par la COX (Nikolic et coll, 2001). Les espèces radicalaires produites au cours de cette réaction, dont les radicaux peroxy, pourraient être les médiateurs de cette oxygénation. Le produit de la 12-lipoxygénase (12-LOX) semble favoriser la métastase de ce cancer. De plus, elle est capable d'augmenter la motilité et le caractère invasif *in vitro* par un mécanisme impliquant l'activation de la protéine kinase C (Gao et coll, 1995). Les produits de la 5-LOX favorisent la survie de ces cellules cancéreuses et jouent un rôle moins important dans la croissance de ces cellules. Les lignées cellulaires cancéreuses humaines hormono-dépendantes ou non sont très résistantes puisque capables de survivre plus d'une semaine privées de sérum (Ghosh et coll, 1997 ; Ghosh et coll, 1998). Cependant, un inhibiteur de 5-LOX, comme le MK886, induit l'apoptose chez ces cellules, qui meurent alors après 8 heures. L'addition de 5-HETE, produit de la 5-LOX, prévient la mort cellulaire. L'AA lui-même peut stimuler la croissance des cellules. Les cancers de la prostate chez l'homme ont tendance à former des métastases dans l'os. La 5-LOX joue un rôle important dans la biologie de l'os et de la moelle osseuse, en conditionnant notamment la maturation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes ou la prolifération et la maturation des cellules myéloïdes (Stenke et coll, 1994). Il a d'ailleurs été montré chez des souris déficientes pour le gène de la 5-LOX, l'absence d'ostéoclastes (Bonewald et coll, 1997 ; Franchi-Miller et coll, 1995). Ainsi, l'activité anti-apoptotique de la 5-LOX peut jouer un rôle dans la capacité des cellules de cancer de la prostate à survivre et à pousser dans des sites osseux en dépit de la privation en androgène.

Tous ces éléments suggèrent que l'inhibition de l'activité de COX-2 pourrait avoir un effet thérapeutique important dans le contrôle de ces différentes tumeurs.

Le traitement de patients à haut risque de cancer colorectal (Krishnan et coll, 2001) par 81 mg d'aspirine pendant 28 jours réduit la concentration en PGE₂ de la muqueuse colorectale, sans modifier le risque de cancer colorectal.

1.4.4.k. COX et os

Les ostéoclastes sont les uniques cellules multinuclées, dérivées des cellules souches hématopoïétiques responsables de la résorption osseuse. L'induction de l'expression de COX-2 est impliquée dans la résorption osseuse en induisant la différenciation des ostéoclastes par l'intermédiaire des interleukines (Koide et coll, 1999 ; Onoe et coll, 1996). De plus, une étude récente a montré que COX-2 est impliquée dans la fonction normale des ostéoblastes (Boyan et coll, 2001). Les inhibiteurs de COXs diminuent la fonction des ostéoblastes. L'inhibition sélective de l'une ou l'autre des isoformes de la COX provoque la diminution de l'expression

phénotypique des ostéoblastes, mais leur fonction peut être maintenue. Cependant, l'inhibition sélective n'affecte pas l'activité de la phosphatase alcaline qui est l'enzyme importante dans les stades précoces de la différenciation et dans l'établissement de la calcification (Owen et coll, 1990). La COX constitutive est nécessaire pour la fonction et la différenciation des ostéoblastes.

1.5. Voie de la lipoxygénase

1.5.1. Les leucotriènes

Les leucotriènes (LTs) sont des médiateurs biologiques importants, impliqués dans l'inflammation et les troubles allergiques. Ils sont répartis en deux catégories : 1) le LTB₄, composé participant au chimiotactisme des neutrophiles ; 2) les cystéinyls leucotriènes, LTC₄, LTD₄ et LTE₄ formant un groupe d'entités actives connues comme des substances d'action lente (Samuelsson, 1983) (Figure 18).

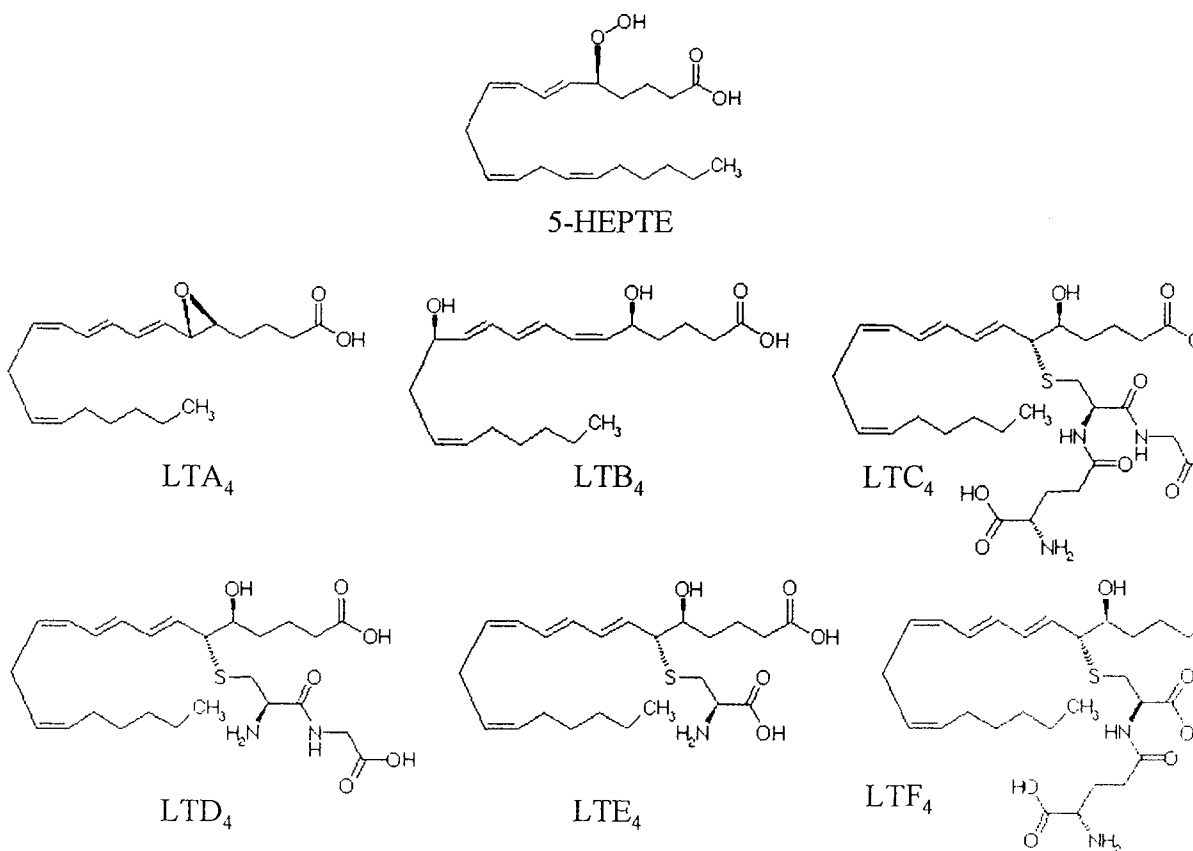


Figure 18 Structure chimique des leucotriènes et de leur précurseur, le 5-HEPTE

1.5.2. Les lipoxygénases (LOX)

Les LOXs forment un groupe d'enzymes non-héminiques, ferriques comprenant une activité cyclooxygénasique, catalysant l'incorporation d'un atome d'oxygène dans les acides gras contenant un 1,4-*cis,cis*-pentadiène. Certaines de ces enzymes, telles que les 5-LOX, 12-LOX et 15-LOX, ont été mises en évidence dans différentes cellules au niveau du site inflammatoire. La 5-lipoxygénase (5-LOX) catalyse les deux étapes initiales de la biosynthèse des LTs à partir de l'AA, la première correspond à une oxygénation stéréospécifique permettant la formation de l'acide (5S)-hydroxyperoxy-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraénoïque (5-HPETE) et la deuxième à la déshydratation conduisant à la formation du LTA₄, intermédiaire instable (Radmark et coll, 1980a et b), pouvant être transformé par la suite de façon enzymatique ou non-enzymatique. La transformation non-enzymatique conduit à la formation du 5,6-diHETE et du 5,12-diHETE (Maycock et coll, 1982). L'époxyde hydrolase, LTA₄ hydrolase, catalyse la transformation du LTA₄ en LTB₄ (Radmark et coll, 1984). Le LTA₄ peut également être conjugué avec le glutathion par la LTC₄ synthase pour former le LTC₄ (Figure 19) (Radmark et coll, 1980a). De même, des clivages successifs par la γ -glutamyl transférase (Orning et Hammarstrom, 1980) et par une dipeptidase (Lee et coll, 1983) convertit le LTC₄ en LTD₄ et LTE₄. C'est à l'occasion des études sur la voie de la 5-LOX que le métabolisme transcellulaire des LT a été mis en évidence (Marcus, 1986). Ainsi, le LTA₄ produit par les neutrophiles peut être transformé en LTB₄ soit par cette même cellule soit par les hématies. La 5-LOX se distingue des autres isoformes de LOX par son activité Ca²⁺ et ATP-dépendante. De plus, c'est à cette occasion que le rôle des protéines activatrices membranaires ou « Five Lipoxygenase Activating Protein » (FLAP) a été montré (Dixon et coll, 1990 ; Abramovitz et coll, 1993). En effet, la 5-LOX est normalement présente dans le cytoplasme des cellules dans lesquelles elle est exprimée (leucocytes, monocytes, basophiles et lymphocytes T), mais en réponse à une augmentation des taux de Ca²⁺ intracellulaire, elle est transloquée vers la membrane cellulaire où elle se lie au FLAP (Rouzer et coll, 1988). Le FLAP agit comme une protéine accessoire qui facilite le transfert de l'AA vers l'enzyme (Abramovitz et coll, 1993).

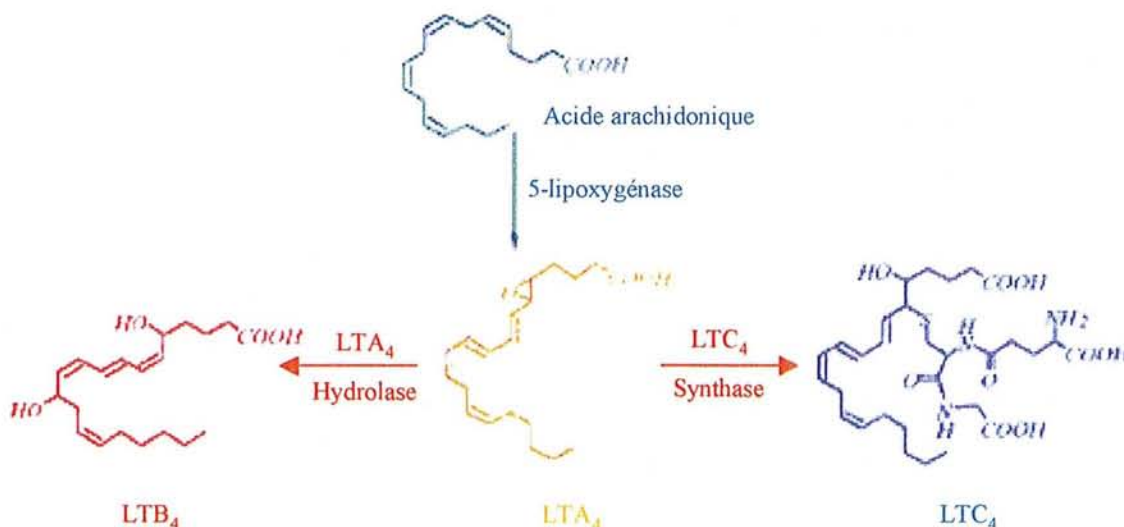


Figure 19 Biosynthèse du LTB₄ et du LTC₄

Tableau 5 Principaux rôles biologiques des leucotriènes

Effet	LT impliqué
Augmentation de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales	LTB ₄
Augmentation de la perméabilité vasculaire	LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄
Stimulation du chimiotactisme pour les neutrophiles et pour les autres granulocytes (à un moindre degré)	LTB ₄
Stimulation du chimiotactisme pour les éosinophiles dans la muqueuse des voies respiratoires	LTD ₄ , LTE ₄
Stimulation de la sécrétion d'anion superoxyde et dégranulation des leucocytes	LTB ₄
Stimulation de la libération d'IL-5,-6 et d'IL-8 par les lymphocytes T	LTB ₄
Augmentation de l'expression des récepteurs IgE de faible affinité sur les cellules B et synthèse d'IgE induite par l'IL-4	LTB ₄
Augmentation du tonus musculaire et des sécrétions bronchiques	LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄
Prolifération et remodelage des muscles lisses respiratoires	LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄

La 5-LOX est activée par le Ca²⁺ et l'ATP (Rouzer et coll, 1986). La 5-LOX activée est toujours membranaire (Rouzer et coll, 1986 ; Wong et coll, 1988).

Elle joue un rôle clé au cours de l'asthme et de l'inflammation (Tableau 5), notamment dans le développement de l'œdème, et est responsable de la synthèse de LTB₄, des lipoxines et des cystéinyls leucotriènes. C'est pour ces raisons que la 5-LOX est devenue une cible thérapeutique. Il existe des molécules ayant un pouvoir inhibiteur double sur la COX et la 5-LOX (Hidaka et coll, 1994 ; Ikuta et coll, 1987 ; Wong et coll, 1992 ; Unangst et coll, 1994). Ces inhibiteurs sont supposés avoir des propriétés inhibitrices supérieures en tant qu'anti-inflammatoires, avec un profil de tolérance améliorée. Ceci serait expliqué par le rôle des LTs synthétisés par la 5-LOX au cours de l'inflammation et au niveau des effets secondaires induits par les AINS (Brain et Williams, 1990 ; Vaananen et coll, 1992 ; Guslandi, 1987 ; Asako et coll, 1992).

La P12-LOX est une forme de LOX exprimée au niveau des plaquettes. Elle catalyse la transformation de l'AA en acide 12-hydroperoxyeicosatétraénoïque (12-HPETE), réduit en 12-HETE. Il existe une forme de 12-LOX exprimée dans les leucocytes (L12-LOX), permettant la transformation de l'AA en 12-HPETE et de 15-HPETE à un plus faible niveau. Les produits de la LOX, synthétisés au niveau des synoviocytes au cours de la polyarthrite rhumatoïde peuvent participer à l'accumulation cellulaire au niveau de la membrane synoviale et du liquide synovial, tout comme à l'activation cellulaire conduisant à la destruction de l'articulation (Bonnet et coll, 1995).

1.6. L'hypothèse d'existence d'une 3^{ème} isoforme de la COX

Les compagnies pharmaceutiques ont développé des tests simples pour l'identification de l'activité anti-inflammatoire des molécules, comme le modèle d'inflammation à la carragénine.

Les différents modèles expérimentaux d'inflammation sont caractérisés par la succession de la libération de différents médiateurs comme l'histamine, la 5-hydroxytryptamine, les kinines et les PGs (DiRosa et coll, 1971). Aux stades précoces, les anti-histaminiques ont une activité anti-inflammatoire. De plus, ces changements de migration de polynucléaires puis de monocytes sont aussi observés. Ils sont dus à des modifications des facteurs chimiotactiques et d'expression des molécules d'adhésion cellulaire. De plus, l'apoptose des cellules polynucléaires conduit à la dominance des monocytes (Willoughby et coll, 2000).

Dans le modèle de pleurésie à la carragénine, les inhibiteurs de COX-2 montrent une activité anti-inflammatoire très précocément dans la réaction inflammatoire, à partir du moment où l'expression de COX-2 est détectée, comme le font les inhibiteurs classiques, tel que l'indométacine. Après 6 heures, les inhibiteurs sélectifs de COX-2 n'ont plus d'effet, alors que l'efficacité des inhibiteurs classiques persiste. A ce point, la protéine de COX-2 n'est plus détectée par western blot. Qui plus est, à 48 heures, alors que l'inflammation est en rémission, une seconde augmentation de l'expression d'une protéine de type COX-2 est détectée par western blot (Figure 20). Cependant, il a été montré *ex vivo* par ajout d'AA que cette protéine ne produit pas de PGE₂ pro-inflammatoires mais, par contre, produit *in vivo* des PGs anti-inflammatoires comme PGD₂, PGF_{2α} ou 15d-PGJ₂.

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que cette protéine synthétisée tardivement (48 heures) pourrait représenter une 3^{ème} isoforme de la COX, COX-3, qui, contrairement à COX-1 et à COX-2 ne produirait pas de PGs pro-inflammatoires, mais les prostanoïdes anti-inflammatoires.

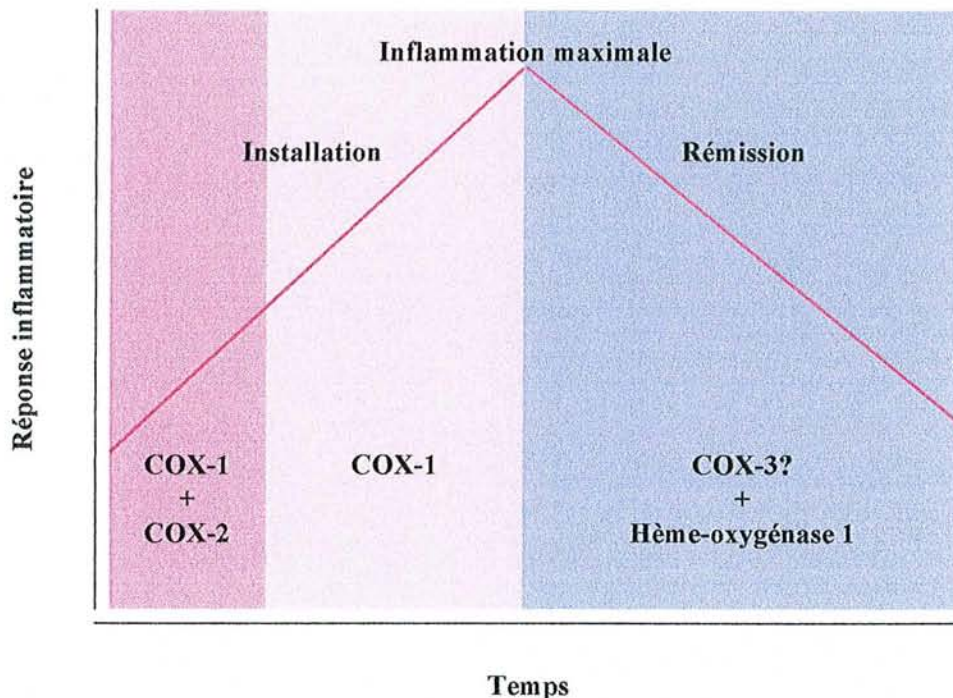


Figure 20 Expression des isoenzymes de COX pendant les phases d'installation et de rémission de l'inflammation (d'après Willoughby et coll, 2000)

L'expression de ce variant catalytique de COX-2 ou d'une 3^{ème} isoforme de COX a été montré *in vitro* dans des macrophages traités pendant 48 heures par de fortes doses d'AINS (Simmons et coll, 1999). Cette isoenzyme, détectée par des anticorps anti-COX-2, semble

sensible à l'inhibition par le paracétamol, mais est moins sensible aux autres AINS, en comparaison à l'activité COX-2 induite par le LPS.

Cette 3^{ème} isoforme de COX pourrait être exprimée seulement dans certaines circonstances. En effet, cette protéine COX-2-like produit des PGE₂ dans des macrophages transformés sous l'effet d'AA exogène, alors qu'elle n'est pas capable d'en réaliser la synthèse dans les échantillons de pleurésie à 48 heures avec un apport d'AA exogène. Il n'est d'ailleurs pas possible de détecter les PGE₂ dans les exudats au même temps. L'induction de la synthèse de cette isoforme pourrait dépendre de l'activation des PPARs (Lehman et coll, 1997).

La production de 15d-PGJ₂ à 48 heures par cette COX-3 dans le modèle de pleurésie à la carragénine (Gilroy et coll, 1999) constitue un lien avec d'autres mécanismes endogènes d'inflammation, tels que la protéine de choc thermique hème-oxygénase-1 (Colville-Nash et coll, 1998). Expérimentalement, l'induction de cette protéine a des propriétés anti-inflammatoires équivalentes ou plus importantes que celles des stéroïdes dans les modèles d'inflammation (Willis et coll, 1996).

Si cette hypothèse est vérifiée, l'expression de COX-3 pourrait survenir dans les périodes de rémission de certaines pathologies inflammatoires, comme la polyarthrite rhumatoïde. Chez l'homme, il serait important de disposer de marqueurs de l'activité de la maladie, afin de pouvoir arrêter la médication (inhibiteurs de COX-2 ou inhibiteurs équipotents) pendant les périodes de rémission, puisque l'utilisation des inhibiteurs de COX pourrait retarder la survenue normale des périodes de rémission.

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

Les AINS sont utilisés en thérapeutique depuis très longtemps, puisque l'écorce de saule, contenant la salicine, était appréciée dans l'Antiquité pour ses propriétés antalgique et antipyrétique. Plus récemment, le centenaire de l'acide acétylsalicylique ou aspirine a été célébré. A l'heure actuelle, les AINS demeurent une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, que ce soit dans le contexte de la prescription médicale ou celui de l'automédication. On estime ainsi que plus de 30 millions de personnes prennent quotidiennement un AINS pour les soulager d'affections aussi diverses que les poussées inflammatoires de la polyarthrite rhumatoïde ou de l'arthrose, la symptomatologie douloureuse associée aux pathologies musculo-tendineuses, post-opératoires, migraineuses, ou aux dysménorrhées. Ils sont cependant considérés comme une « arme à double tranchant » (Lichtenstein et coll, 1995) puisqu'ils sont responsables d'environ 16 500 décès par an aux Etats-Unis chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde ou d'arthrose, c'est-à-dire autant que le nombre de morts du SIDA en 1997 dans le même pays (Wolfe et coll, 1999). Les effets indésirables digestifs et, à un moindre degré, rénaux demeurent la principale limitation de l'utilisation prolongée des AINS classiques en rhumatologie (Pairet et Netter, 1999).

II.1. Mode d'action des AINS

Il y a 30 ans, Vane proposa un mécanisme d'action pour les molécules de type aspirine et les AINS : l'inhibition de la biosynthèse des PGs (Vane, 1971). L'inhibition par l'aspirine est causée par l'acétylation irréversible du site cyclooxygénasique de la COX, laissant le site peroxydase de l'enzyme libre. Les autres AINS comme l'ibuprofène ou l'indométacine, inhibent la COX de façon réversible ou irréversible en entrant en compétition avec le substrat de l'enzyme, l'AA, pour son site actif (Figure 21).

Il a été montré récemment que l'inhibition préférentielle de COX-2 par le NS-398 permettait non seulement d'inhiber l'activité de COX-2 mais aussi de réduire l'expression de son gène dans des synoviocytes humains arthritiques et arthrosiques (DiBattista et coll, 2001).

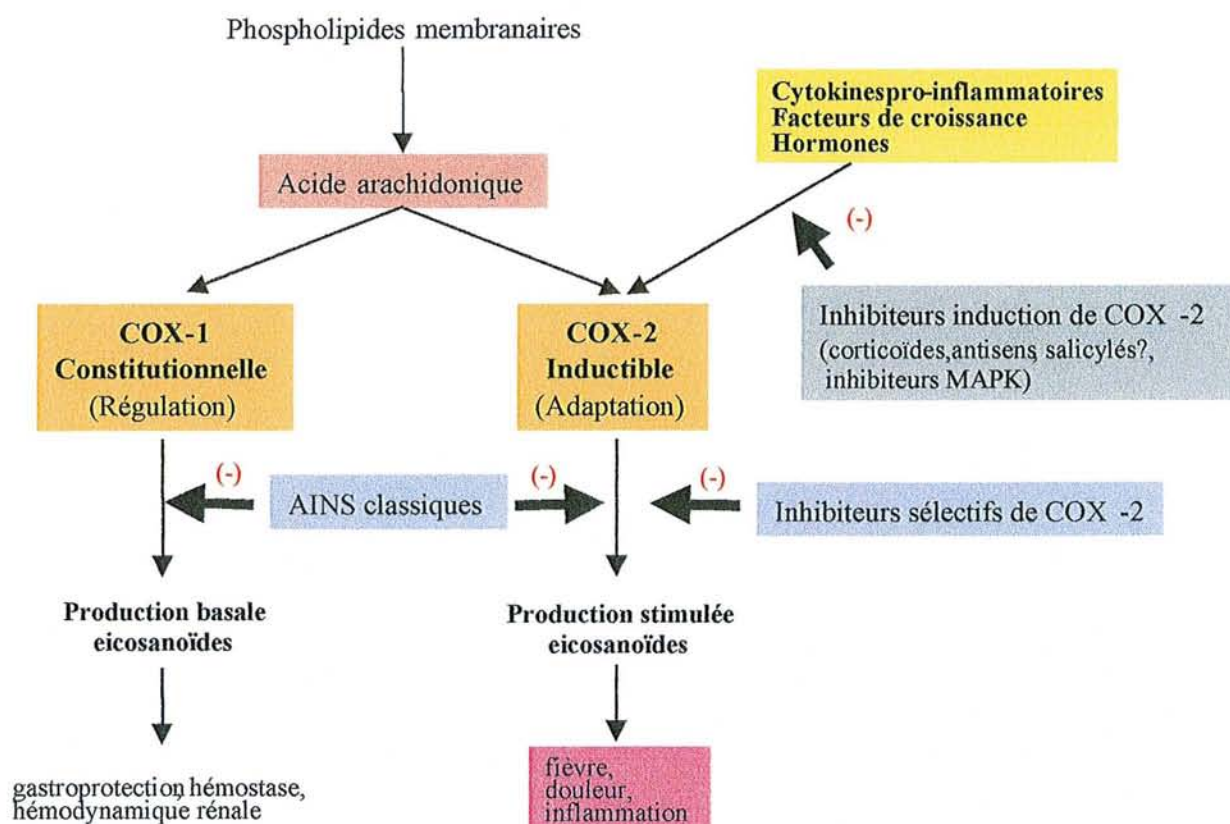


Figure 21 Mode d'action des AINS sur la voie de biosynthèse des PGs

II.2. Classification des AINS classiques

Ces inhibiteurs peuvent être classés en deux grands groupes : les acides carboxyliques et les acides énoïques, qui peuvent eux-mêmes être subdivisés en au moins 7 groupes selon leur structure chimique (Figure 22) (Terlain et coll, 1996) :

- les acides salicyliques
- les acides phénylacétiques
- les acides indoacétiques
- les acides propioniques
- les acides anthraniliques
- les pyrazolones
- les oxicams

Pendant longtemps, on a cru que la présence d'un groupement acide était un pré-requis pour les AINS classiques. Aujourd'hui, on sait que cette caractéristique structurale permet la formation d'une liaison saline entre la fonction carboxylique de l'anti-inflammatoire et l'Arg120 de la COX, provoquant ainsi l'inhibition de l'activité COX-1.

En fonction de leur structure chimique, les AINS inhibent différemment COX-1 et COX-2. Ceci leur confère leurs activités anti-inflammatoire et analgésique mais aussi leurs effets secondaires indésirables, notamment au niveau du tractus gastro-intestinal (Carabazza et coll, 1996).

Tous les AINS commercialisés sont capables d'inhiber COX-1 et COX-2. La sélectivité d'inhibition des COXs est importante à considérer pour le développement des AINS à effets indésirables réduits. Le développement des inhibiteurs sélectifs de COX-2, avec un profil pharmacologique attrayant et des effets secondaires réduits, a été favorisé (Dannhardt et Kiefer, 2001).

II.3. Base de la sélectivité des AINS

Les AINS ayant des caractéristiques différentes, l'inhibition des COXs par ces molécules aboutit à des effets différents. L'AINS idéal serait donc capable d'inhiber la voie enzymatique associée aux effets délétères des PGs (COX-2) tout en conservant l'activité de la voie enzymatique associée à leurs effets physiologiques (COX-1). Ainsi, la production des PGs protectrices, aussi bien au niveau de l'estomac que du rein, serait préservée, et l'activité anti-inflammatoire maintenue. Dans cette optique, les propriétés analgésiques et anti-inflammatoires des AINS classiques ne sont pas remises en cause, seules leurs tolérances gastro-intestinale et rénale sont à prendre en considération.

Le concept de sélectivité des AINS repose sur des arguments structuraux et cinétiques.

• Arguments structuraux

Certains arguments prennent en compte les différences structurales révélées par les études cristallographiques des deux isoformes de COX. En effet, le canal hydrophobe de COX-2 étant plus large que celui de COX-1, il pourrait interagir avec des molécules de plus grande taille et/ou ayant une chaîne latérale susceptible de se positionner dans la poche latérale. Il est d'ailleurs légitime de supposer que les modifications structurales mineures (changement de conformation de l'enzyme par exemple) puissent conduire à des modifications majeures des cinétiques d'inhibition enzymatique (Figure 24).

• Arguments cinétiques

Les anti-inflammatoires sont capables d'inhiber les COXs de quatre façons (Gierse et coll, 1999):

- ◆ Inhibition irréversible par fixation covalente (aspirine et valérylsalicylate) provoquant l'acétylation de la Ser530 ou 516.
- ◆ Inhibition réversible compétitive : l'AINS entre en compétition avec le substrat pour le site de fixation selon un équilibre régi par la loi d'action de masse (ibuprofène, piroxicam et la majorité des arylpropioniques)
- ◆ Inhibition d'interaction lente, réversible et dépendante du temps de COX-1 et de COX-2. Une étude récente a suggéré que l'interaction lente puisse être de faible affinité (oxicams et naproxène). L'indométacine et le flurbiprofène semblent produire des interactions ioniques entre leur fonction acide carboxylique et le résidu Arg de l'enzyme. Cet effet semble influencer l'hélice D de la protéine, suivi par une perte remarquable de la flexibilité de l'enzyme
- ◆ Inhibition lente, irréversible et dépendante du temps de forte affinité (indométacine, flurbiprofène, méclofénamate, célécoxib et rofécoxib). Les inhibiteurs sélectifs de COX-2

sont capables d'inhiber compétitivement COX-1 et d'interagir lentement avec COX-2 (Ouellet et Percival, 1995).

La base de la sélectivité d'inhibition des nouvelles classes d'inhibiteurs hautement sélectifs de COX-2 réside dans leur capacité à inhiber COX-2 d'une manière dépendante du temps, sans inhiber COX-1 de façon temps dépendante (Gierse et coll, 1995 ; Copeland et coll, 1994). Par exemple, l'inhibition de la COX par le célécoxib comprend une inhibition compétitive initiale, avec une affinité identique pour COX-1 et COX-2 (Gierse et coll, 1999). L'inhibition lente, dépendante du temps intervient suite à la formation d'un complexe binaire avec COX-2, mais pas avec COX-1, et apparaît contribuer largement à la potentialité et à la sélectivité d'inhibition du célécoxib. Les hétérocycles diaryles peuvent inhiber COX-2 en prenant avantage de la poche latérale du site actif, n'existant pas dans COX-1 (Gierse et coll, 1996 ; Guo et coll, 1996). Cependant, tous les inhibiteurs agissant de façon dépendante du temps ne bénéficient pas de l'espace supplémentaire aménagé par la poche latérale. Certains composés n'ont pas la structure adéquate pour interagir avec la poche latérale mais sont tout de même capables d'une inhibition dépendante du temps, comme les acides carboxyliques qui interagissent avec l'Arg120. Dans ce cas, l'acide carboxylique est transformé en ester de méthyle (Figure 24).

II.3.1. L'hypothèse COX-2

Cette hypothèse propose qu'à des doses efficaces, les inhibiteurs sélectifs de COX-2 causent moins d'effets secondaires gastro-intestinaux graves que ceux causés par les AINS classiques. Le développement clinique des inhibiteurs sélectifs de COX-2 repose sur deux hypothèses : i) l'inhibition de COX-2 est nécessaire et suffisante pour une efficacité anti-inflammatoire et analgésique, et ii) l'inhibition de COX-1 est responsable en majeure partie de la toxicité digestive des AINS classiques (Mardini et Fitzgerald, 2001).

« Un inhibiteur sélectif de COX-2 est avant tout un anti-inflammatoire non-stéroïdien n'inhibant pas l'activité COX-1 et non une molécule inhibant plus efficacement l'activité COX-2 qu'un AINS classique » (Vane et Warner, 2000).

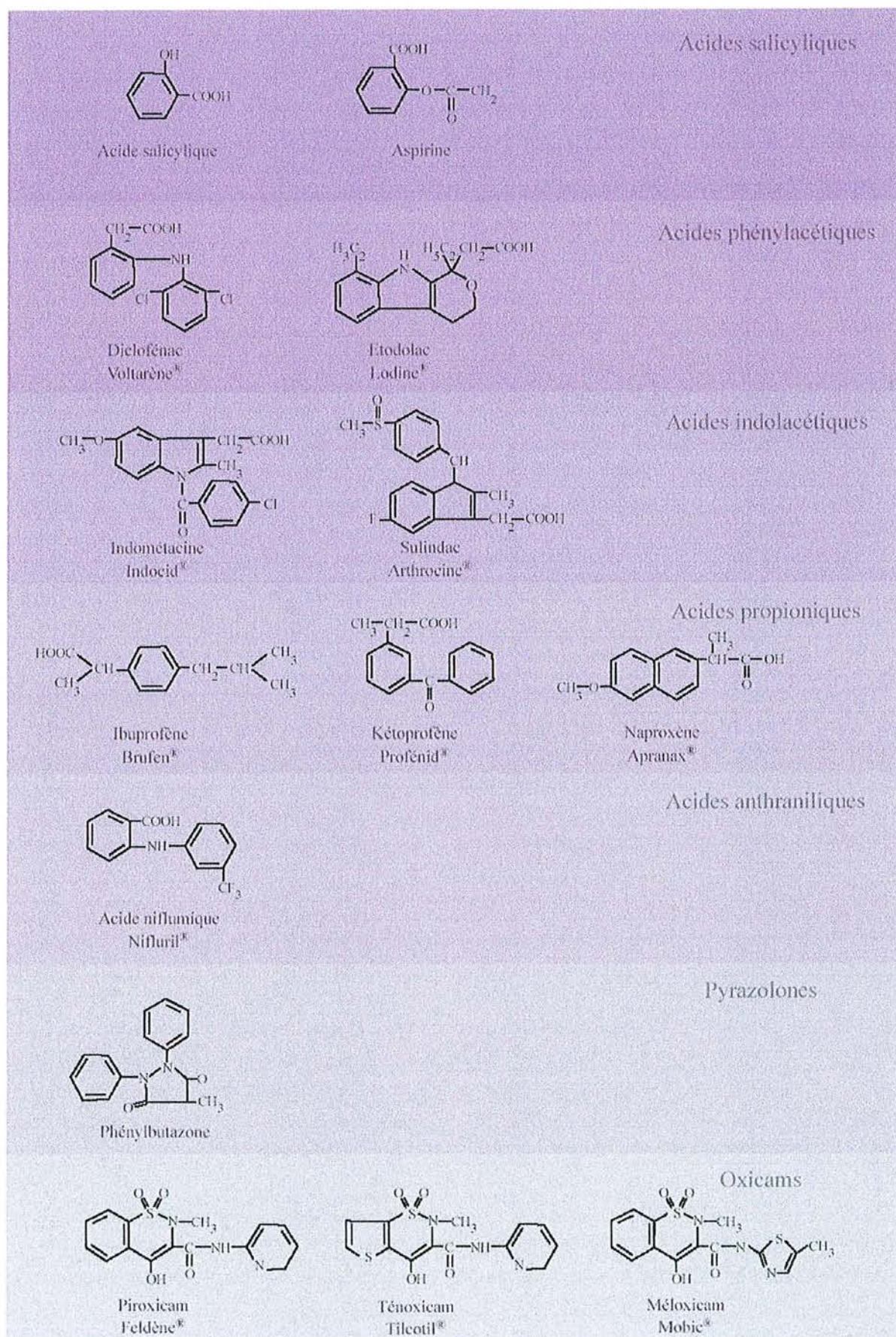


Figure 22 Structure chimique et classification de quelques AINS

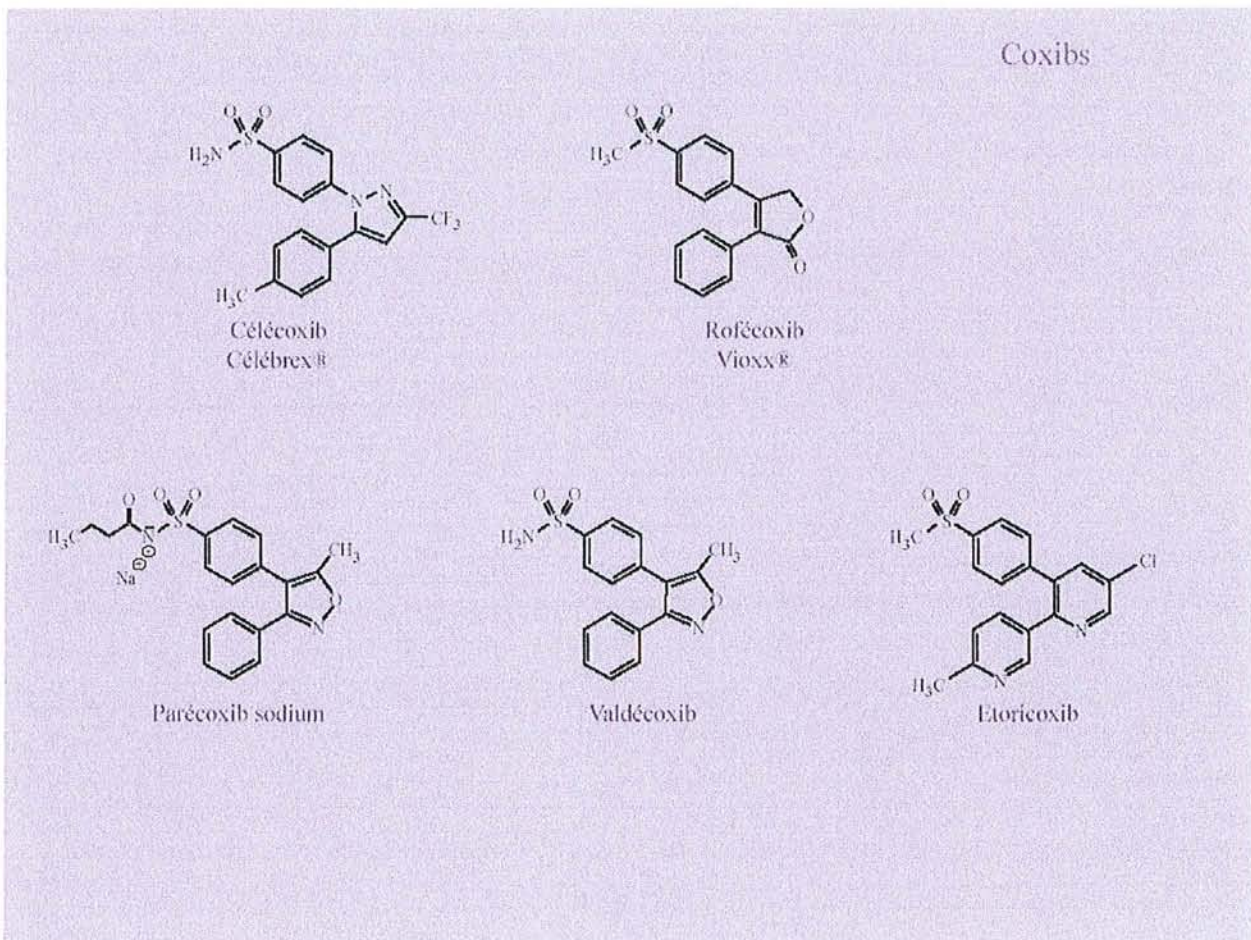


Figure 23 Structure chimique des inhibiteurs sélectifs de COX-2

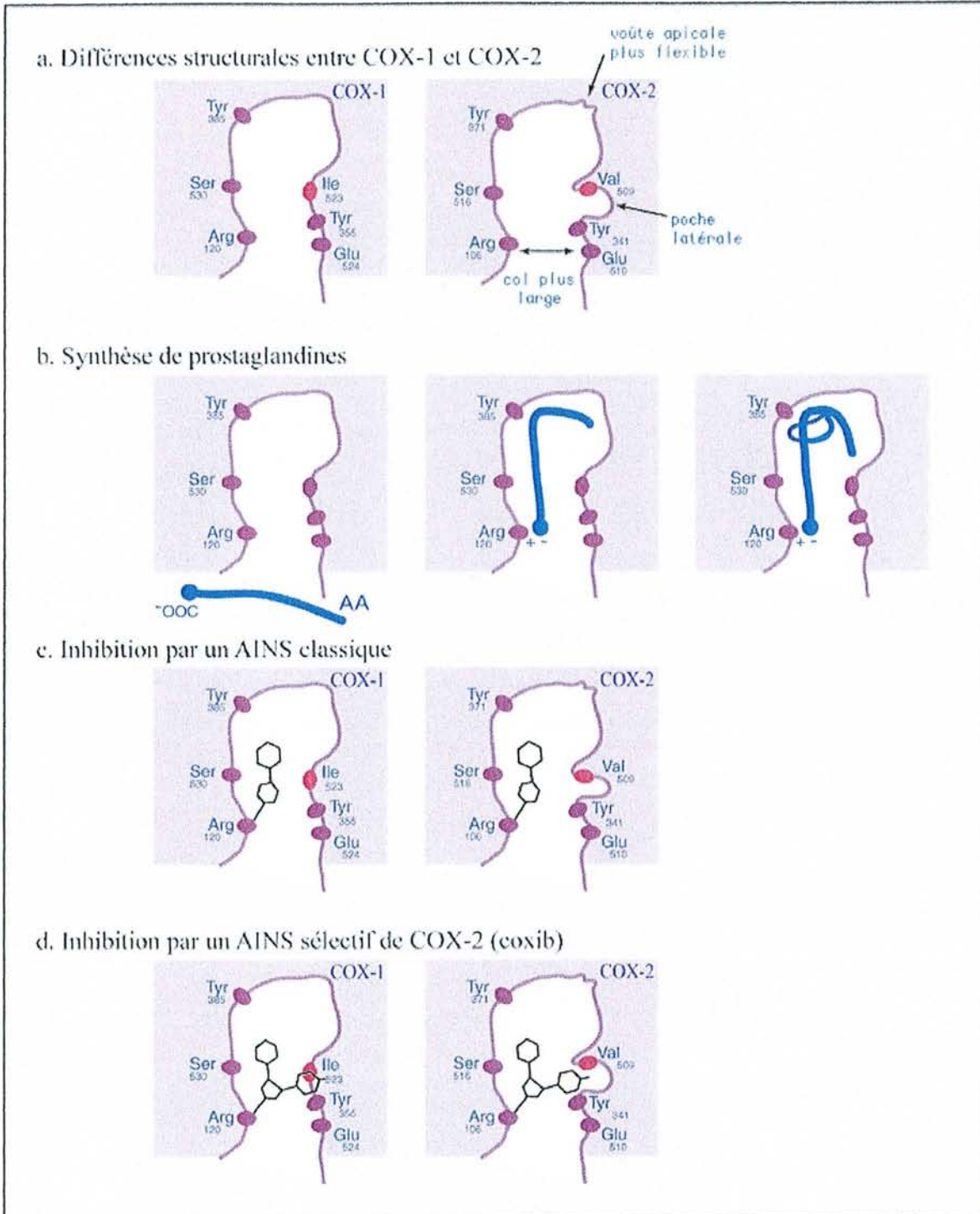


Figure 24 Différences structurales entre les sites actifs de COX-1 et de COX-2, synthèse des prostaglandines et principaux modes d'action des AINS (adapté de Hawkey, 1999)

II.3.2. Mise en évidence de la sélectivité *in vitro*

L'inhibition de COX par les AINS a été démontrée dans de nombreux systèmes, comme des préparations microsomiales d'enzymes, des cellules ou des tissus, ou des organismes entiers (Tableau 6). Toutes ces méthodes permettent de calculer des DE₅₀ (dose efficace permettant d'inhiber 50% d'activité de l'enzyme) des différents AINS pour COX-1 et COX-2, conduisant ainsi à l'estimation d'un rapport de sélectivité COX-2/COX-1.

Ainsi, plus la valeur sera voisine de zéro, plus l'AINS sera considéré comme sélectif de COX-2. Bien que très variables selon les systèmes expérimentaux utilisés (Jouzeau et coll, 1997 ; Pairet et Van Ryn, 1998), ces rapports permettent de classer les AINS en 4 catégories : les inhibiteurs sélectifs de COX-1 (faible dose d'aspirine), les inhibiteurs non-sélectifs (forte dose d'aspirine, indométacine, diclofénac, ibuprofène, naproxène et piroxicam), les inhibiteurs préférentiels COX-2 (méloxicam) et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (célécoxib, rofécoxib) (Frölich, 1997). Cette définition de la sélectivité doit cependant également prendre en compte la sélectivité d'inhibition tissulaire aux posologies utilisées en thérapeutique (Jouzeau et coll, 1997 ; Pairet et Van Ryn, 1998 ; Lipsky, 1999). Un inhibiteur ayant le rapport de DE₅₀ le plus faible possible serait susceptible, a priori, d'avoir un indice bénéfice/risque le plus favorable. Plus récemment (Kawai et coll, 1998), les rapports de sélectivité d'inhibition COX-2/COX-1 ont été déterminés par l'inhibition de la production de PGE₂ dans des synoviocytes humains *in vitro* stimulés par l'IL-1 β pour l'activité COX-2 et par la production de TxB₂ par la COX-1 plaquettaire. De même, il a été montré (Horton et coll, 1999) que la mesure des taux de PGE₂ dans des fibroblastes 3T3 et macrophages J774.2 murins et dans des lignées cellulaires établies, stimulées ou non (A23187, LPS) et traitées par des inhibiteurs (aspirine, indométacine ou DEX) permettait de déterminer les index de sélectivité en s'affranchissant de la mesure de l'activité COX, difficile à effectuer dans ces conditions.

Tableau 6 Tests *in vitro* utilisés pour caractériser le pouvoir inhibiteur des AINS sur COX-1 et COX-2

COX-1	COX-2
Vésicule séminale ovine	Placenta de mouton
Cellules endothéliales aortiques bovines	Macrophages de souris stimulés au LPS ¹
Plaquettes humaines	Cellules mésangiales de rat stimulées à l'IL-1 ²
Macrophages non-stimulés de cobaye	Macrophages stimulés de cobaye ³
Enzyme recombinante de souris	Enzyme recombinante de souris
Lignées cellulaires humaines ex. cellules de lymphome histiocytique U-397	Lignées cellulaires humaines ex. cellules d'ostéocarcinome 143.98.2
Enzyme recombinante humaine (enzyme purifiée ⁴ , microsomes ⁵ , homogénats ⁶ , cellules ⁷)	Enzyme recombinante humaine (enzyme purifiée, microsomes, homogénats, cellules)
Muqueuse gastrique humaine	Monocytes humains stimulés au LPS ⁸
Plaquettes humaines isolées	Monocytes humains stimulés au LPS
Sang total humain coagulé	Sang total humain stimulé au LPS ^{9, 10, 11}

1: Mitchell et coll, 1993; 2: Klein et coll, 1994; 3: Engelhardt et coll, 1996; 4: Barnett et coll, 1994, Copeland et coll, 1994; 5: O'Neill et coll, 1994, Glaser et coll, 1995, Laneuville et coll, 1994; 6: Gierse et coll, 1996; 7: Cromlish et Kennedy, 1996, Kargman et coll, 1995; 8: Tavares et Bennett, 1993; 9: Patrignani et coll, 1994; 10: Young et coll, 1996; 11: Grossman et coll, 1995

II.4. Les inhibiteurs préférentiels de COX-2

La caractéristique de ces molécules est d'inhiber préférentiellement COX-2. Ces molécules pourraient donc présenter l'intérêt de conserver les propriétés anti-inflammatoires des AINS classiques, tout en ayant une meilleure tolérance digestive et/ou rénale (Vane et coll, 1994).

Deux molécules commercialisées en France, le méloxicam (Mobic[®]) et le nimésulide (Nexen[®]) ont les caractéristiques des inhibiteurs préférentiels de COX-2.

Le méloxicam est un énoicarboxamide, appartenant à la famille des oxicams (Noble et Balfour, 1996). Le méloxicam (4-hydroxy-2-méthyl-N-(5-méthyl-2-thiazolyl)2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide) est un dérivé du piroxicam, AINS énoïque de la famille des oxicams (Noble et Balfour, 1996). Il est capable d'inhiber COX-2, dans différents systèmes, 3 à 77 fois plus que COX-1 (Pairet et coll, 1998 ; Patrignani et coll, 1997). Plusieurs modèles cellulaires ont suggéré sa capacité d'inhiber préférentiellement COX-2 par rapport à COX-1, ce qui a conduit certains auteurs à proposer que son profil de tolérance clinique, plus favorable que celui d'AINS classiques, soit la conséquence d'une inhibition préférentielle de COX-2 (Distel et coll, 1996). Sa sélectivité d'inhibition limitée conduit à le classer dans la classe des inhibiteurs préférentiels de COX-2 (Tableau 7 et Tableau 10). Il n'est pas capable de se lier à la poche latérale de COX-2 mais peut exploiter la plus grande flexibilité dans le site actif de cette enzyme par rapport à l'apex de COX-1.

Le méloxicam a une demi-vie d'élimination de 20 heures chez l'homme et de 16 heures chez le rat. Cette demi-vie longue permet une administration quotidienne unique aux doses de 7,5 ou 15 mg chez l'homme. Le méloxicam se lie de 99,5 à 99,7% aux protéines plasmatiques et, comme tous les acides faibles, principalement à l'albumine. Il est plus ou moins bien et lentement absorbé, atteint sa concentration plasmatique maximale (*T_{max}*) 5 à 6 heures après l'administration orale et présente une biodisponibilité de 89 % (Türk et coll, 1997). Comme tous les AINS, il a la capacité de pénétrer dans les articulations inflammatoires (liquide synovial au cours de l'arthrite par exemple) où les concentrations sont égales à 50 % de celles observées dans le plasma. Sa clairance est identique chez l'homme et chez le rat (0,11 ml/min/kg) et son élimination est à la fois biliaire (30 %) et rénale (70 %) (Engelhardt et coll, 1995). Quatre métabolites principaux du méloxicam ont été identifiés chez le rat et chez l'homme, issus majoritairement d'une biotransformation hépatique faisant intervenir les cytochromes P450 2C9 et 3A4. Les métabolites sont rapidement éliminés dans les urines sans glucuronoconjugaison, et ne sont pas détectables dans le plasma. Ces métabolites n'ont pas d'effets inhibiteurs sur COX et n'ont aucun effet analgésique ou anti-inflammatoire après administration orale chez le rat (Engelhardt et coll, 1996). Les études cliniques ont montré son efficacité à des doses comprises entre 7,5 et 22,5 mg par jour (Noble et Balfour, 1996 ; Linden et coll, 1996 ; Hosie et coll, 1996 ; Wojtulewski et coll, 1996). Le méloxicam a été commercialisé en France depuis 1997 pour le traitement symptomatique de courte durée des poussées aiguës de rhumatismes et le traitement au long cours des rhumatismes inflammatoires chroniques (PR notamment) et de certaines arthroses douloureuses et invalidantes. Il possède expérimentalement des propriétés anti-inflammatoires dans des modèles classiques et une toxicité gastro-intestinale modérée dans des modèles aigus de tolérance (Tableau 7).

Tableau 7 Efficacité de plusieurs anti-inflammatoires dans différents modèles expérimentaux (d'après Engelhardt et coll, 1995; Engelhardt, 1996)

	Méloxicam	Piroxicam	Indométacine	Diclofénac	Naproxène
Œdème au kaolin DE ₃₅ (mg/kg)	3,35	2,71	3,42	4,03	6,25
Arthrite à l'ACF					
- réaction primaire	0,17	0,61	ND	0,97	14,3
- réaction secondaire	0,12	0,67	0,67	1,24	11,8
DE ₅₀ (mg/kg/j)					
Douleur inflammatoire à 90 min (levure de bière) DE ₁₅₀ (mg/kg)	5,64	6,06	3,09	2,23	8,18
Fièvre (levure de bière) DI _{-1,0°C} (mg/kg)	9,01	4,54		1,99	8,18
Ulcérations gastroduodénales DE ₅₀ (mg/kg/j)	2,47	1,07	2,35	2,71	11,1

(DE₃₅=dose inhibant 35% de l'œdème ; DE₅₀= dose inhibant 50% de l'augmentation du volume de patte; DE₁₅₀=dose augmentant le seuil de douleur de 50% ; DI_{-1,0°C}=dose faisant baisser la fièvre de 1,0°C en 2 heures ; DE₅₀=dose provoquant une ou plusieurs ulcération dans 50% de la population)

Le nimésulide a été introduit en 1985 (Davis et coll, 1994). Sa structure lui permet d'accéder à la poche latérale de COX-2. Il est capable d'inhiber COX-2 5 à 16 fois plus que COX-1 (Tavares et coll, 1995). Son absorption orale est presque complète avec une T_{max} comprise entre 1,2 et 3,2 heures. Il est métabolisé et éliminé avec une demie-vie de 1,6 à 5,0 heures. Les études cliniques ont mis en évidence ces propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-pyrétiques dans différentes conditions. Dans le modèle du sang total, le nimésulide a démontré sa capacité à inhiber la synthèse inductible des prostanoïdes. Cependant, malgré un rapport de sélectivité de 20, les doses plasmatiques de nimésulide sont suffisamment élevées pour inhiber la COX-1 plaquettaire (Panara et coll, 1998). Cependant, il n'est pas considéré comme un inhibiteur sélectif de COX-2 parce qu'il est utilisé à des doses conduisant à la perte de sélectivité pour COX-2.

Le méloxicam et le nimésulide ont montré une plus faible incidence des effets secondaires gastro-intestinaux.

Deux autres AINS sont bien tolérés, l'étodolac (Glaser et coll, 1995) et le nabumétone (Hallyar et Bjarnasson, 1995). Il pourrait s'agir d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 mais on ne dispose pas de suffisamment de preuves (Cipollone et coll, 1995).

II.5. Les inhibiteurs sélectifs de COX-2

La caractéristique de ces molécules est d'inhiber sélectivement COX-2.

Le composé DuP-697 est un puissant anti-inflammatoire, dans de nombreux systèmes, avec un potentiel inhibiteur relativement fort sur la synthèse des PGs dans les vésicules séminales bovines (Gaus et coll, 1990). Ce composé a une forte activité inhibitrice sur COX-2. Ceci a été à l'origine de la recherche de nouveaux anti-inflammatoires inhibant sélectivement COX-2 (Figure 23 et Figure 24).

Les inhibiteurs de COX-2 peuvent être classés selon leur différences structurales :

1. les éthers diaryl- et aryl-hétéroaryles (les inhibiteurs sulfonilides) : nimésulide, NS-398, flosulide
2. les hétérocycles diaryles vicinales: célécoxib, rofécoxib, SC-57666, DuP-697
3. les AINS modifiés pour augmenter leur pouvoir inhibiteur sur COX-2 : L-748780, L-761066, méloxicam, étodolac
4. les composés anti-oxydants
5. les dérivés 1,2-diaryléthylène (cis-stilbènes)

II.5.1. Les éthers diaryl- et aryl-hétéroaryles

Le premier inhibiteur sélectif de COX-2 de cette classe est le NS-398, dont la structure diffère totalement de celle des AINS classiques. Cette molécule est capable d'inhiber la synthèse des PGs dans des cellules inflammatoires et s'est avérée être sans effet secondaire indésirable dans les modèles expérimentaux animaux. De plus, elle n'affecte pas la production des PGs dans l'estomac et le rein.

Il existe deux autres composés très proches du NS-398, d'un point de vue structural, le nimésulide (inhibiteur préférentiel) et le flosulide, une structure éther diaryl et triéther respectivement, partageant une entité méthanesulfonilamide (Patrignani et coll, 1994 ; Huff et coll, 1995 ; Davis et Brogden, 1994). La structure sulfonamide avec sa fonction acide NH semble être indispensable.

II.5.2. Les hétérocycles diaryles

Les composés de cette classe comportent un cycle central carbocyclique ou hétérocyclique supporté par deux entités aryles vicinales (Figure 23). Ils sont encore couramment appelés dans la littérature composés tricycliques. Ils appartiennent au groupe le plus important des inhibiteurs sélectifs de COX-2.

L'hétérocycle permet l'orientation appropriée des cycles aromatiques dans l'espace et donc la fixation à l'enzyme. Les cycles pyrazole et cyclopentanone paraissent les mieux appropriés pour l'inhibition spécifique de COX-2. La substitution d'un cycle aromatique par un groupement méthylsulfonyl ou sulfonamide en position para permet une activité optimale (Talley, 1999).

La substitution en position 4 sur l'un des cycles aromatiques par un groupement sulfonamide ou méthylsulfonylamide est essentielle pour l'inhibition. D'ailleurs, le remplacement d'un groupement méthylsulfonylamide par un groupement sulfonamide réduit la sélectivité d'inhibition pour COX-2 mais augmente la biodisponibilité orale (Li et coll, 1995).

Ces pré-requis structuraux sont indispensables pour permettre l'activité inhibitrice sur COX-2 et conduisent à la formations d'analogues substitués asymétriques. Le composé DuP-697, avec un cycle thiophénique bromo-substitué, est un représentant typique répondant à ces pré-requis. Cependant, les données cliniques avec cette molécule ont montré qu'elle avait une très longue demi-vie plasmatique (242 h) chez l'homme, à cause de sa recirculation entéro-hépatique. Cette molécule n'est utilisée aujourd'hui que comme un outil pharmacologique (Pinto et coll, 1999).

Deux des hétérocycles substitués ont un intérêt particulier : le dérivé 1,5-diarylpyrazole ou célécoxib et le dérivé 3,4-diarylfuranone ou rofécoxib.

Le célécoxib (Celebrex[®]) a été approuvé pour le traitement de l'arthrose et de la polyarthrite en 1998 (Tableau 8). Il a montré un profil optimal *in vitro* et *in vivo*. Il est efficace *in vitro*, où il est capable d'inhiber sélectivement COX-2 (CI_{50} COX-1=13 μ mol, CI_{50} COX-2=0,04 μ mol) (Tableau 10 et Tableau 11) et il a une activité anti-inflammatoire importante chez le rat au cours de la polyarthrite à l'adjuvant (DE_{50} =0,4 mg/kg) (Penning et coll, 1997 ; Simon et coll, 1998) (Tableau 9). Utilisé à 400 mg/kg/j, le célécoxib a des propriétés analgésiques et anti-phlogistiques, équivalentes à 1000 mg de naproxène ou à 150 mg de diclofénac. Il est contre-indiqué en cas de grossesse et chez des patients ayant des antécédents d'ulcères gastro-intestinaux ce qui fournit une preuve supplémentaire sur le rôle de COX-2 dans la cicatrisation des ulcères.

Le rofécoxib (Vioxx[®]) a eu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de l'arthrose et l'arthrite en Europe et aux Etats-Unis, et pour le traitement de la douleur aiguë et des douleurs menstruelles aux Etats-Unis uniquement. Il a été approuvé dans la communauté européenne pour le traitement de l'arthrose (Ehrich et coll, 1999) (Tableau 8 et Tableau 9).

L'étoricoxib, le valdécoxib, le parécoxib sodium et le JTE-522 (Tableau 12) sont les derniers inhibiteurs sélectifs de COX-2 de cette classe chimique. Le valdécoxib est un dérivé diarylisoxazole en cours d'évaluation clinique pour le traitement de la douleur et de l'inflammation. Il n'a qu'un faible potentiel inhibiteur sur COX-1 (CI_{50} =140±19 μ mol), alors qu'il inhibe COX-2 avec une CI_{50} =0,005±0,001 μ mol dans un système d'enzymes recombinantes humaines. Ces résultats expérimentaux ont été confirmés *in vivo* dans des modèles animaux (inflammation aiguë dans l'œdème à la carragénine, inflammation chronique au cours de l'arthrite à l'adjuvant ou encore le modèle de la poche à air à la carragénine), où il inhibe la synthèse des PGs au niveau du site inflammatoire (Talley et coll, 2000). Le valdécoxib est métabolisé chez les rongeurs et le chien en un dérivé hydroxyméthyle ayant une activité anti-inflammatoire. Les substances comme le célécoxib ou le rofécoxib, sont très peu solubles, ce qui empêche leur administration par la voie parentérale. Le développement du parécoxib sodique, pro-drogue du valdécoxib, sous une forme injectable augmente les possibilités d'utilisation, comme dans des cas d'inflammation aiguë (Talley et coll, 2000).

Le JTE-522 est actuellement en phase II d'essai clinique pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et de l'arthrose. Il semble être l'une des molécules les plus sélectives de COX-2 avec une valeur de CI_{50} pour les COX-2 ovine et recombinante humaine de 0,64 et 0,085 μ mol respectivement, en étant incapable d'inhiber la COX-1 plaquettaire humaine ou ovine jusqu'à des concentrations de 100 μ mol. Aucun ulcère gastrique n'a été constaté aux doses thérapeutiques, ne provoquant aucune inhibition de la synthèse des PGs par COX-1 dans la muqueuse gastrique (Wakitani et coll, 2000).

II.5.2.a. Célécoxib (Celebrex[®])

Il s'agit d'un composé dérivé du 1,5-diaryl pyrazole (Penning et coll, 1997). Son IC_{50} (dose inhibant de 50% l'activité enzymatique) pour COX-2 est de 4×10^{-8} mol/L et de $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L pour COX-1. Il est 375 fois plus sélectif de COX-2 que de COX-1, d'après les études

sur les enzymes recombinantes humaines, mais il peut s'avérer moins sélectif dans d'autres systèmes (Lipsky et Isakson, 1997). Le célécoxib à la dose de 600 mg deux fois par jour (dose 50% plus importante que celle utilisée au cours des essais cliniques) n'a pas d'effet sur les taux de thromboxane sérique ou la fonction plaquettaire (Mengel-Gaw et coll, 1997). Il est rapidement absorbé avec une T_{max} de 3 heures. Il est largement métabolisé et éliminé avec une demie-vie de 11,2 heures. Son utilisation est recommandée à 100 mg deux fois par jour dans la polyarthrite rhumatoïde et de 200 mg une fois par jour dans l'arthrose.

Des doses uniques chez des volontaires sains sont bien tolérées (McAdam et coll, 1999). Toutes les doses testées (100, 400 et 800 mg) sont capables d'inhiber la formation de PGE_2 stimulée par le LPS *ex vivo*, à un degré atteint avec 800 mg d'ibuprofène. Des différences inter-individuelles ont pu être observées au cours de cette étude, et même si la sélectivité du célécoxib pour COX-2 était relative, elles n'influencent en aucun cas l'agrégation plaquettaire dépendante du TxA_2 *ex vivo*. Par contre, le célécoxib a des effets comparables à ceux de l'ibuprofène sur la suppression de la sécrétion de PGI-M (métabolites urinaires du Tx et de la prostacycline). Le célécoxib est aussi responsable de la suppression du 6-kéto $PGF_{1\alpha}$ urinaire. Ces résultats ont confirmé le rôle de COX-2 dans la biosynthèse des PGI_2 systémiques et rénales dans des conditions physiologiques, chez le sujet jeune.

Le célécoxib est métabolisé chez l'homme par un métabolisme oxydatif (Paulson et coll, 2000). Cette réaction consiste en une oxydation du groupement méthyle pour former un métabolite méthylhydroxy, puis en acide carboxylique. Le glucuronide formé à partir du métabolite acide carboxylique est aussi produit chez l'homme.

Il existe une spécificité dépendante du sexe dans la clairance du célécoxib. Chez le rat, il est éliminé du plasma 4 fois plus vite chez le mâle ($t_{1/2}=3,73$ h) que chez la femelle ($t_{1/2}=14,0$ h). La clairance est de 7,76 ml/min/kg chez le mâle et de 1,99 ml/min/kg chez la femelle (Paulson et coll, 2000). Les différences de pharmacocinétique des xénobiotiques liées au sexe sont courantes et ont été attribuées à une expression sexe-spécifique des gènes du CYP2C et du CYP3A (Waxman et coll, 1985). L'administration par voie veineuse conduit à l'élimination biliaire et/ou intestinale du célécoxib. Après une administration orale de 20 à 400 mg/kg, 7% de la dose est retrouvée dans les urines et 88 à 94% sont retrouvés dans les fécès.

Les taux tissulaires maximums de célécoxib après une administration orale de 2 mg/kg sont trouvés après 1 heure, à l'exception du gros intestin et du coecum, où le maximum est retrouvé après 8 heures. Après 96 heures, les taux tissulaires sont en dessous des limites de détection.

Tableau 8 Pharmacologie clinique des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Molécules	Célécoxib (SC-58635)	Rofécoxib (MK-0966)
Laboratoires	Pharmacia	Merck
AMM (France)	16/11/2000	21/04/2000
Indications	Arthrose-PR	Arthrose
Posologie	200 mg/j (OA, maxi 400 mg) 200-400 mg/j (PR)	12,5 à 25 mg/j
Formes pharmaceutiques	Gélules	Comprimés Suspension buvable
Paramètres pharmacocinétiques		
Biodisponibilité orale	? (57 à 86% chez l'animal)	93%
T _{max}	2 à 4 h	2 à 4 h
V apparent de distribution	300-600 L (4,2 à 8,4 L/kg)	70-90 L (1 à 1,3 L/kg)
Fixation protéique	97%	87%
Demi-vie d'élimination	8-12 h	17 h (9-21 h)
[GR]/Plasma	0,89	-
Rythme d'administration	Biquotidienne (sauf OA)	Quotidienne
Clairance	27-29 L/h	7/8 L/h
Métabolisme	Hépatique	Hépatique
Enzymes impliquées	CYP-2C9 (polymorphisme)	Cytosol.+CYP-450
Sélectivité <i>in vitro</i> sang total	Ratio CI ₅₀ COX-1/-2= 7,5	Ratio CI ₅₀ COX-1/-2= 35

Tableau 9 Efficacité des inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans les modèles expérimentaux

	Célécoxib	Rofécoxib
Œdème carragénine (DE ₅₀ en mg/kg)	7	1,5
Arthrite à l'adjuvant (DE ₅₀ en mg/kg/j)	0,37	0,74
Fièvre à la levure de bière (DE ₅₀ en mg/kg)	-	0,24
Perte fécale hématies ⁵¹Cr (DU ₅₀ en mg/kg/j)	>200	>200

Tableau 10 Index de sélectivité du naproxène, AINS classique, du méloxicam, inhibiteur préférentiel de COX-2 et des deux inhibiteurs sélectifs de COX-2 disponibles, le célécoxib et le rofécoxib dans le système de sang total chez l'homme (inhibition de la COX-1 plaquettaire et de la COX-2 monocytaire)

	$CI_{50}COX-1/CI_{50}COX-2$
Naproxène	0,7
Méloxicam	18
Célécoxib	30
Rofécoxib	267

Tableau 11 DE_{50} du célécoxib sur la COX-2 dans différents modèles expérimentaux d'inflammation

	DE_{50} (mg/kg)
Oedème de la patte	7
Prostaglandine dans la poche à air	0,2
Arthrite à l'adjuvant	0,3
Lésion aiguë gastro-intestinale	>200

II.5.2.b. Rofécoxib (Vioxx®)

Il s'agit d'une molécule ayant émergé d'un programme de développement de dérivés méthylsulphonylphényl (4-[4-(méthylsulfonyl)phényl]-3-phénylfuran-2(5H)-one). Dans les lignées cellulaires exprimant spécifiquement COX-1 ou COX-2, le rofécoxib inhibe COX-2 recombinante humaine avec une CI_{50} de $1,8 \times 10^{-8}$ mol/L et COX-1 avec une CI_{50} de $1,5 \times 10^{-5}$, c'est-à-dire qu'il est 800 fois plus sélectif de COX-2 (Lanza et coll, 1997). Dans le système du sang total, avec des doses uniques, la CI_{50} pour COX-2 est $7,7 \times 10^{-7}$ mol/L, alors que celle pour COX-1 n'a pu être déterminée dans ces conditions, avec des doses allant jusqu'à 1000 mg (Tableau 10) (Ehrich et coll, 1999; Depre et coll, 2000 ; Van Hecken et coll, 2000).

Sa concentration plasmatique maximale (C_{max}) après l'administration d'une dose unique de 25 mg est de 207 $\mu\text{g/L}$, et après des administrations répétées de 25 mg, elle est de 321 $\mu\text{g/L}$. Sa T_{max} est de 2 à 3 heures (Tableau 8) (Scott et Lamb, 1999). Les valeurs de C_{max} sont dépendantes de la dose, mais au-delà de 50 mg, la dose-dépendance diminue à cause de la faible solubilité de la molécule. Sa biodisponibilité est de 93% quand il est administré à des doses de 12,5, 25 et 50 mg. A des concentrations plasmatiques comprises entre 0,05 et 25 mg, 87% se lie aux protéines plasmatiques chez l'homme. Le volume apparent de distribution à l'état d'équilibre est de 91 L pour une dose de 12,5 mg et de 86 L pour une dose de 25 mg. Sa clairance plasmatique est de 8,46 et 7,2 L/h à des doses respectives de 12,5 et 25 mg. Sa demie-vie est d'approximativement 17 heures. Son élimination est hépatique. Seul 1% est retrouvé dans les urines. Ses principaux métabolites sont ses dérivés cis-dihydroxyle et trans-dihydroxyle et un glucuronide dérivé de la forme hydroxylée.

Il provoque moins d'ulcères gastro-intestinaux à des doses allant jusqu'à 250 mg par jour que l'ibuprofène (800 mg 3 fois par jour) ou l'aspirine (650 mg 4 fois par jour) sur une période de 7 jours. Aucune différence n'est observée entre le groupe traité avec le rofécoxib et le groupe placebo.

Le rofécoxib a été testé chez des patients souffrant d'arthrose de la hanche et du genou. Deux types d'étude clinique ont été réalisés. Le premier consistait en une recherche de dose (Ehrich et coll, 1999) et le second en une étude comparative du rofécoxib à des AINS de référence comme le diclofénac (Cannon et coll, 2000), l'ibuprofène (Saag et coll, 2000 ; Day et coll, 2000) ou le nabumétone (Truitt et coll, 2000). Tous les essais ont utilisé les mêmes critères : réponse globale du patient au traitement, estimation de l'état global par l'investigateur, douleur lors de la marche sur une surface plane.

Dans la première série d'essai, le rofécoxib a été administré à des doses allant de 5 à 50 mg, en une prise unique quotidienne. L'efficacité du rofécoxib a pu être mise en évidence par comparaison au groupe placebo. Ensuite, il s'est avéré aussi efficace que le diclofénac, sur une période de 26 semaines, à l'ibuprofène ou au nabumétone sur une période de 6 semaines. L'administration orale de rofécoxib à la dose de 50 mg a des effets analgésiques similaires à ceux du naproxène sodique, de l'ibuprofène ou du paracétamol codéiné (Morrison et coll, 2000 ; Chang et coll, 2001) dans le cas de douleurs dentaires post-opératoires.

Les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ont été traités par 50, 25 ou 5 mg de rofécoxib et ont été comparés à un groupe placebo pendant 8 semaines. La dose de 5 mg s'est avérée identique au placebo. 49% des patients dans le groupe 25 mg et 53% des patients dans le groupe 50 mg ont répondu au traitement, taux supérieurs à ceux du groupe placebo. Significativement moins de patients ont arrêté le traitement dans ces deux groupes pour cause de manque d'efficacité (Cannon et coll, 2000).

Le rofécoxib est aussi efficace que l'ibuprofène (400 mg) dans le traitement de la fièvre causée par une infection des voies respiratoires. La dose de 25 mg est plus efficace que celle de 12,5 mg et que le placebo (Cannon, 2000).

Le rofécoxib aux doses uniques quotidiennes de 12,5 et 25 mg est généralement bien toléré chez les patients arthrosiques ou souffrant de douleurs aiguës. Les effets secondaires les plus couramment observés sont la diarrhée, les céphalées, la nausée et les infections respiratoires.

Lors des études comparatives, la survenue des effets secondaires avec le rofécoxib était identique à ceux de l'ibuprofène (800 mg, 3 fois par jour). Les effets secondaires de la partie supérieure du tube digestif (perforations, ulcérations et saignements) sont significativement moins fréquents avec le rofécoxib à 12,5, 25 et 50 mg qu'avec l'ibuprofène 800 mg, le diclofénac 50 mg ou le nabumétone 500 mg, 3 fois par jour (1,5 contre 2,68%). L'incidence cumulative des ulcérations gastro-duodénales (≥ 3 mm) avec le rofécoxib est plus faible que celle avec l'ibuprofène, chez des patients souffrant d'arthrose, et est similaire à celle du groupe placebo (Hawkey et coll, 1999).

L'inhibition sélective de COX-2 au niveau du sang peut être associée à l'augmentation des événements thromboemboliques. Avec le rofécoxib, le taux de ces accidents est de 3 pour 100 patients par année d'exposition au médicament (Daniels et Seidenberg, 1999). Il n'existe pas de données permettant de relier ces accidents thromboemboliques au manque d'inhibition de la COX-1 plaquettaire par le rofécoxib.

Les études réalisées chez les volontaires âgés sains avec le rofécoxib à la dose de 50 mg ont montré des conséquences similaires de celles de l'indométacine à 50 mg, 3 fois par jour ou à ceux du placebo pendant 2 semaines. L'excrétion de sodium diminue aussi bien avec le rofécoxib qu'avec l'indométacine pendant les premières 72 heures de traitement et retourne

ensuite à la normale avec les deux molécules. Le débit de filtration glomérulaire n'est pas diminué chez les patients recevant le rofécoxib alors que l'indométacine le diminue (Cannon et coll, 2000 ; Schnitzer et coll, 1999).

II.5.2.c. Etoricoxib

Des données précliniques récentes ont mis en évidence le pouvoir d'inhibition sélective de COX-2 d'un agent actif oral, l'étoricoxib (MK-663) [5-chloro-2-(6-méthylpyridin-3-yl)-3-(4-méthylsulfonylphényl)pyridine] (Figure 23) (Riendeau et coll, 2001). Cette nouvelle molécule a une efficacité comparable à celle des AINS classiques dans différents modèles d'inflammation, de douleur et de fièvre chez le rongeur. Elle est 100 fois plus sélective pour COX-2 que pour COX-1 dans différentes cellules et dans le système du sang total. Elle ne paraît produire aucun effet inhibiteur sur la prostacycline synthase ($CI_{50} > 100 \mu M$)

Tableau 12 Principales caractéristiques des inhibiteurs sélectifs de COX-2 en développement (d'après Agrawal et coll, 2001 ; Talley et coll, 2000 a et b; Sorbera et coll, 2001)

Molécule	Etoricoxib	Valdécoxib	Parécoxib
Nom de code	MK-663	SC-65872	SC-69124A
Laboratoires	Merck	Pharmacia	Pharmacia
Particularités structurales	Pyridinyl-phényl-pyridine méthylsulfone	Diaryl-isoxazole sulfonamide	Diaryl-isoxazole sulfonamide (propanamide du Valdécoxib)
Effets pharmacologiques expérimentaux			
Œdème à la carragénine (DE ₅₀ en mg/kg)	0,6±0,1	10,2±1,4	---
Douleur à la carragénine (Randall et Selitto) (DE ₅₀ en mg/kg)	0,3±0,1	---	5,0 (voie IV)
Arthrite à l'adjuvant (DE ₅₀ en mg/kg à J21)	0,6±0,1	0,03±0,01	0,08 (voie IV)
Sélectivité <i>in vitro</i> Sang total	Ratio CI_{50} COX-1/-2= 106	Ratio CI_{50} COX-1/-2= 30	Pro-drogue Conversion totale en Valdécoxib (30')
Développement	Phase III	Phase III	Phase III
Voie administration	orale	orale	Parentérale (IV, IM)
Indications potentielles	OA-PR-douleurs	OA-PR-douleurs	Douleurs (post-opératoires ++)
Effets cliniques			
Arthrose (poussées) Douleurs dentaires	30-60 mg/j pdt 2 mois 120 mg = 400 mg Ibu ou 550 mg Npx	10 et 20 mg/j efficaces ---	--- 40>20 mg = 30 mg de Kéto
Douleurs post-op.	---	---	40 mg (i.v) = 30 mg Kéto > Mor 4 mg
Tolérance digestive	Absence excrétion ⁵¹ Cr GR (120 mg/j pdt 28 j)	Ulcères/érosions = Pcb (20 mg/j pdt 12 sem)	Absence ulcères GD/érosions (40 mg x2 pdt 7j < Kéto 15 mgx4 pdt 5j)

II.6. Effets des AINS

II.6.1. Effets gastro-intestinaux

Depuis 1938, les effets toxiques (érosion aiguë de la muqueuse gastrique et ulcération chronique) de l'aspirine sont connus (Douthwaite et Lintot, 1983). A partir des années 60, la prescription de nouvelles molécules « non-aspirine », les AINS, tel que l'indométacine, a elle aussi été associée à ce genre de complications. De nombreuses études épidémiologiques au cours des 20 dernières années ont établi que l'utilisation de l'aspirine et des AINS est liée à l'apparition d'ulcère et des complications qui y sont associées, notamment chez le sujet âgé. Les AINS augmentent de 3 à 10 fois les risques de saignement et de perforation d'ulcères, d'hospitalisation et de décès (Hawkey, 1990 ; Langman et coll, 1994 ; Henry et coll, 1996 ; Somerville et coll, 1986 ; Carson et coll, 1987 ; Griffin et coll, 1991 ; Laporte et coll, 1991). Il semble que les AINS soient responsables de la moitié des décès causés par les ulcères. De plus, la relation entre les AINS et *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) a récemment été faite. En effet, des études ont montré que l'infection par *H. pylori* augmentait les risques courus lors de l'utilisation d'AINS (Hawkey, 2000).

Les AINS classiques sont la cause majeure de lésions gastro-intestinales iatrogéniques (Paulus et coll, 1985 ; Langman, 1989 ; Lockard et coll, 1980). La toxicité des AINS est évidente au niveau de l'estomac et du duodénum. Il y a prévalence des ulcères chez 10 à 25% des patients prenant des AINS avec une proportion importante de mortalité et de morbidité (Gabriel et coll, 1991 ; Armstrong et Blower, 1987). Certaines études (Garcia-Rodriguez et Jick, 1994) ont pu montrer un risque augmenté de 3 à 4 fois par rapport aux personnes ne prenant pas d'AINS. On a pu également montrer que les risques augmentaient avec les doses utilisées. Les AINS peuvent aussi atteindre le petit intestin, conduisant à de nombreux dommages, allant du changement de perméabilité jusqu'à l'inflammation et l'ulcération, pouvant conduire à l'anémie (Bjarnason et coll, 1987).

La plupart des AINS classiques inhibent les deux isoformes de COX de la même manière (Laneuville et coll, 1994). L'identification de composé inhibant sélectivement COX-2 (Chan et coll, 1995 ; Khanna et coll, 1997) a permis de réaliser de grands progrès en terme de réduction des effets indésirables. Ces molécules présentent l'avantage d'inhiber COX-2 sur le site de l'inflammation tout en préservant COX-1 dans l'estomac et aussi au niveau des plaquettes, diminuant ainsi les risques de troubles digestifs.

Une étude récente (Shah et coll, 2001) a comparé les effets gastro-intestinaux *in vivo* du naproxène (AINS classique, non-sélectif) à ceux du nimésulide, un inhibiteur préférentiel de COX-2 (Cullen et coll, 1998 ; Taniguchi et coll, 1995) et a montré que l'utilisation du nimésulide était liée à moins d'effets indésirables gastro-intestinaux que le naproxène, sur une base endoscopique et fonctionnelle. Les effets de l'inhibition sélective de COX-2 ont pu être observés à court terme mais aussi à plus long terme, notamment au niveau de la réduction des saignements et des perforations. La plupart des lésions de la muqueuse gastro-intestinale régressent spontanément même si la prise du médicament continue (Buttgereit et coll, 2001). Cependant, certains patients développent des lésions sévères. Ceci correspond à des ulcères de

3 mm de diamètre et d'une profondeur notable. Ces ulcères peuvent progresser vers des complications fatales, comme le saignement ou la perforation.

Une autre étude (Morteau et coll, 2000) a montré que les deux isoformes de COXs jouent un rôle important au niveau de la défense de la muqueuse intestinale chez la souris dans un modèle de colite expérimentale. Les auteurs n'excluent cependant pas que l'expression de l'isoforme inductible, COX-2, soit augmentée au cours de l'inflammation ainsi que son activité. Les résultats suggèrent qu'aucune des isoformes n'est essentielle au maintien de l'homéostasie de la muqueuse en absence d'un stimulus.

II.6.1.a. Mécanisme

Le mécanisme de toxicité gastro-intestinale des AINS peuvent être dépendants ou non des PGs.

L'inhibition de synthèse des PGs est toxique pour l'estomac et le duodénum parce qu'elle supprime les mécanismes prostaglandine-dépendants de défense de la muqueuse, tels que le flux sanguin sous-muqueux et la sécrétion de mucus et de bicarbonates (Wallace et coll, 1995).

La plupart des AINS réduisent l'hydrophobicité phospholipide-dépendante qui permet de maintenir une barrière entre l'eau et l'acide (Lichtenberger et coll, 1995).

Les AINS ont d'autres actions qui contribuent à leur toxicité. A haute concentration, la plupart d'entre eux découplent la phosphorylation oxydative (Thompkins et Lee, 1969 ; Jorgensen et coll, 1976). Comme il s'agit pour la plupart d'acides faibles, ils sont absorbés efficacement à partir du milieu acide de l'estomac, mais ils ont la possibilité de rester dans des zones neutres de la muqueuse, atteignant ainsi des concentrations suffisamment élevées pour découpler la phosphorylation oxydative. L'aspirine en particulier, a un effet irritant local pouvant être détecté par le changement de perméabilité de la barrière de l'estomac, conduisant à un retour des acides dans l'estomac (Davenport, 1964). Ce phénomène n'est pas causé par l'inhibition de synthèse des PGs parce qu'il peut être observé avec le sodium salicylate, qui est très semblable d'un point de vue structure à l'aspirine mais qui n'est pas capable d'inhiber la synthèse des PGs. Les raisons pour lesquelles l'annulation de l'hydrophobicité de la muqueuse ou un changement dans la phosphorylation oxydative conduisent à une irritation locale, ne sont pas connues.

Le mécanisme par lequel les AINS conduisent à l'ulcération, implique la destruction de la défense de la muqueuse, avec une contribution variable de l'irritation locale et des changements métaboliques.

Les AINS ont un rapport différent avec *H. pylori*. En effet, l'infection par *H. pylori* est associée à une inflammation de la muqueuse, à l'apparition de cytotoxines et d'acidité. En induisant une inflammation et la synthèse de PG, *H. pylori* peut potentiellement inverser le mécanisme fondamental de toxicité des AINS. Ceci pourrait expliquer pourquoi les patients infectés par *H. pylori* ne sont pas plus sujets à des complications d'ulcère que ceux qui ne le sont pas (Hawkey, 2000), et pourraient même être dans une certaine mesure protégés (Yeomans et coll, 1998 ; Hawkey et coll, 1998). Ainsi, si *H. pylori* exerce un effet bénéfique en stimulant la synthèse de PGs, on pourrait supposer qu'il est plus évident pour les AINS (pour qui l'inhibition de synthèse des PG est le facteur principal de toxicité) que pour

l'aspirine (faisant intervenir d'autres mécanismes comme l'irritation locale). Cette hypothèse serait confirmée par des études épidémiologiques (Hawkey, 2000).

Des études dans des modèles de gastropathies induites par les AINS chez l'animal, suggèrent qu'il existe une composante acide-indépendante, causant des érosions microscopiques consécutives à l'inhibition de synthèse des PG et intervenant sans relation avec l'acidité intragastrique (Whittle, 1981). Cependant, les érosions plus importantes et profondes macroscopiquement sont plus évidentes avec un pH gastrique bas. Dans les mêmes modèles expérimentaux, il semble que l'inhibition substantielle de la sécrétion d'acide à un pH intragastrique de 4 et plus est nécessaire pour prévenir de l'acidité relative à la prise de l'AINS (Elliot et coll, 1995). Ainsi, il faut une suppression plus profonde des acides pour se protéger contre les dommages causés par les AINS sur la muqueuse que contre l'ulcération causée par *H. pylori*.

II.6.1.b. Effets des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Les effets du rofécoxib sur l'incidence des ulcères de diamètre supérieur à 3 mm, ont été observés pendant 6, 12 et 24 semaines d'utilisation. Dans ces études, le rofécoxib était utilisé à des doses de 25 et 50 mg par jour, en comparaison à un placebo ou à l'ibuprofène à la dose de 2 400 mg par jour (800 mg par prise). L'étude de la tolérance digestive du rofécoxib a porté sur l'étude de différents paramètres : l'étude endoscopique des risques d'ulcère de la partie supérieure du tractus gastro-intestinal (Lanza et coll, 1999), les dommages sur l'ensemble du tractus gastro-intestinal en prenant en compte les changements de perméabilité ou la perte de globules rouges par une étude microscopique (Bjarnason et coll, 1987 ; Hunt et coll, 1998), ou par l'incidence clinique des perforations, ulcères et saignement (Langman et coll, 1999 ; Laine et coll, 1999). Les effets du célécoxib à 100 mg et 200 mg deux fois par jour ou à 200 mg par jour en prise unique ont été étudiés au cours d'une étude endoscopique de 12 semaines, en comparaison à un placebo et au naproxène à 500 mg deux fois par jour, à l'ibuprofène à 800 mg trois fois par jour et au diclofenac à 75 mg deux fois par jour. Ces études ont montré qu'après 12 semaines de traitement, le célécoxib et le rofécoxib ne provoquaient aucune augmentation significative de l'incidence des ulcères gastro-duodénaux par rapport au placebo à toutes les doses utilisées. Au contraire, l'utilisation de ces molécules et du placebo montraient une réduction significative des ulcères. A 6 mois, les deux inhibiteurs sélectifs de COX-2 ont montré une réduction significative de l'incidence des ulcères gastro-intestinaux par rapport aux autres inhibiteurs testés, mais ont montré une légère augmentation, non-significative, par rapport au placebo. D'après ces résultats, il apparaît que le rofécoxib et le célécoxib induisent des ulcères à la même fréquence que le placebo et de façon significativement moins importante que les autres AINS après 12 ou 24 semaines de traitement. Les mêmes effets ont été observés au cours d'étude chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Simon et coll, 1999).

L'étude des effets des inhibiteurs de COX-2, rofécoxib et célécoxib, sur les complications des ulcères (saignement, perforation, pouvant aller jusqu'à la mort) est en cours d'investigation.

Des études *in vitro* sur des hépatocytes stimulés par du LPS ont montré que l'inhibition de l'activité de COX-2 par le NS-398 conduisait à l'augmentation de la synthèse de l'enzyme (Callejas et coll, 1999). Ces résultats ont une importance pharmacologique dans la mesure où

les enzymes nouvellement synthétisées sont actives alors que les concentrations en inhibiteurs diminuent.

II.6.1.c. Effets gastro-intestinaux différents des ulcères

Il existe des effets des AINS dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal différents des ulcères. Ils ne sont cependant pas toujours corrélés avec la présence d'ulcère gastro-intestinal. Ces effets sont importants à prendre en compte pour la tolérance d'un traitement (Buttgereit et coll, 2001).

Une étude de 6 semaines a montré que le rofécoxib, comparé au placebo, était associé à une plus forte incidence de troubles épigastriques et de nausées. Au cours d'une autre étude prenant en compte l'arrêt de traitement et les symptômes liés à l'utilisation des AINS au niveau de la partie supérieure du tube digestif, c'est-à-dire le reflux gastrique, la dyspepsie, les gênes épigastriques, les brûlures, la nausée et les vomissements, le rofécoxib a causé moins d'arrêt de traitement dans les études de 6 et 12 mois en comparaison aux autres AINS. Seule une légère augmentation, en comparaison au placebo, a été observée après 4 mois de traitement.

Des études similaires avec le célécoxib ont montré qu'il avait une incidence légèrement supérieure à celle du placebo mais nettement inférieure à celle des autres AINS.

II.6.2. Système cardio-vasculaire

Il existe des méthodes validées d'étude de la sélectivité des AINS pour l'inhibition des isoformes de la COX (Brideau et coll, 1996 ; Ehrich et coll, 1999). Elles comprennent la mesure *ex vivo* de la diminution des taux de TxB₂, produits spontanément au cours de la coagulation, comme un index de l'activité de COX-1 et la diminution de la production de PGE₂ par les cellules sanguines stimulées par du LPS, comme un index de l'activité de COX-2. C'est dans ces conditions que des molécules comme le rofécoxib ont un fort pouvoir inhibiteur envers COX-2 (Chan et coll, 1999). Cette molécule a montré des propriétés inhibitrices identiques chez l'homme à des doses uniques allant jusqu'à 1000 mg et à des doses répétées allant jusqu'à 375 mg par jour (Ehrich et coll, 1999). Elle s'est avérée efficace dans l'arthrose, à des doses de 12,5 et 25 mg par jour, avec une tolérance beaucoup plus favorable que les AINS classiques, notamment au niveau gastro-intestinal.

Une étude récente a pu montrer que seul le rofécoxib (12,5 et 25 mg par jour), comparé au diclofénac (50 mg, trois fois par jour), à l'ibuprofène (800 mg, trois fois par jour), au naproxène (550 mg, deux fois par jour) et au méloxicam (15 mg par jour), était capable d'inhiber uniquement COX-2 dans le système du sang total. Tous les comparateurs sont capables d'inhiber les deux isoformes de COX (Van Hecken et coll, 2000).

Des thromboses sont survenues chez 4 patients atteints de lupus anti-coagulant circulant sous célécoxib (Crofford et coll, 2000).

Des incidents vasculaires graves ont été observés beaucoup plus fréquemment avec le rofécoxib qu'avec le naproxène au cours de l'étude VIGOR (Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research), (0,8% contre 0,4%) (Mukherjee et coll, 2001 ; Bombardier et coll, 2000). Par contre, au cours de l'étude CLASS (Célécoxib Long-term Arthritis Safety Study)

avec le célécoxib, aucune différence significative concernant les incidents cardiovasculaires n'a été observée entre les différents traitements (Silverstein et coll, 2000).

Il faut cependant considérer que les patients de l'étude VIGOR chez lesquels les incidents cardiovasculaires ont été observés, souffraient de polyarthrite rhumatoïde et qu'ils présentaient un risque accru de thrombose (Wallberg-Jonsson et coll, 1997 et 2000), alors que les patients impliqués dans l'étude CLASS étaient majoritairement arthrosiques, sans risque accru de thrombose. Il est important de noter que la prise d'aspirine était autorisée au cours de l'étude CLASS, alors qu'elle était interdite dans l'étude VIGOR. De plus, le naproxène, comparateur dans l'étude VIGOR, peut être considéré comme un cardioprotecteur. En effet, sa demi-vie permet de supprimer complètement la capacité des plaquettes à synthétiser le TxA_2 , prostanoloïde permettant la vasoconstriction et l'agrégation plaquettaire.

II.6.3. Effet sur la fonction rénale

Les effets indésirables des AINS sont à considérer également au niveau du rein, notamment en ce qui concerne l'homéostasie des solutés et le maintien de la perfusion rénale (Brater, 1999 ; Cryer, 1998 ; Clive et Stoff, 1984). La mise en évidence de l'expression constitutive de COX-2 dans le rein peut laisser penser que l'utilisation des inhibiteurs de COX-2 peut entraîner les mêmes effets indésirables rénaux que les AINS classiques. En inhibant la synthèse des PGs rénales, les AINS induisent une vasoconstriction, pouvant aller jusqu'à une insuffisance rénale aiguë (Whelton et coll, 1999 ; Bennett et coll, 1996 ; Toto et coll, 1986).

Les effets des inhibiteurs sélectifs de COX-2 sur la fonction rénale, célécoxib et rofécoxib, ont été évalués lors d'essais cliniques contrôlés (Rossat et coll, 1999 ; Whelton et coll, 1999 ; Whelton et coll, 2000). Chez le sujet âgé de 65 à 68 ans, le rofécoxib (50 mg/j) induit une diminution de 47% de l'excrétion urinaire de 6-kéto $PGF_{1\alpha}$. Cet effet est comparable à celui de l'indométacine (-53%) (Catella-Lawson et coll, 1999). Dans une autre étude, le rofécoxib administré quotidiennement, aux doses de 12,5 et 25 mg, chez des volontaires sains, réduit l'excrétion urinaire de PGE_2 et de 6-kéto $PGF_{1\alpha}$ d'approximativement 40 à 50%. La même diminution a pu être observée avec le méloxicam (15 mg/j) ou le diclofénac (50 mg en 3 prises quotidiennes) (McAdam et coll, 1999). L'excrétion urinaire de PGE_2 et de 6-kéto $PGF_{1\alpha}$ sous l'effet du célécoxib (200 et 400 mg/j administré en deux fois) chez des sujets âgés, sains ayant un apport en sodium normal est réduit de 65 à 80%. Cette baisse est équivalente à celle observée avec le naproxène (500 mg, deux fois par jour) (Whelton et coll, 2000). Ces observations ont permis d'anticiper les conséquences des inhibiteurs sélectifs de COX-2 sur la fonction rénale.

Les effets éventuels des inhibiteurs de COX-2 ont été étudiés en évaluant le taux de filtration glomérulaire et l'excrétion urinaire de sodium, chez des patients âgés, ayant un apport en sodium normal ou réduit et chez des patients ayant une insuffisance rénale légère ou modérée. De même, les différents essais se sont intéressés à l'incidence des traitements sur l'œdème périphérique, la pression sanguine et l'excrétion de créatinine. Les résultats obtenus ont montré que les inhibiteurs sélectifs de COX-2, célécoxib et rofécoxib, affectent l'homéostasie des solutés ainsi que l'hémodynamique rénale en produisant des changements radicaux au niveau de l'excrétion des PGs urinaires, du taux de filtration glomérulaire, de la rétention du

sodium et du développement de l'œdème périphérique, à un niveau équivalent à celui des AINS classiques (Brater et coll, 2001).

Une étude récente (Rocha et coll, 2001) a montré les effets toxiques de différentes molécules (acide salicylique, paracétamol, NS-398, indométacine et caféine) sur des cellules rénales en culture (cellules de la médulla du tubule collecteur). L'inhibition de COX n'est pas suffisante pour produire ces effets et la toxicité du paracétamol se traduit par le gonflement conduisant à la nécrose et à l'apoptose des cellules.

II.6.4. Cancer

Le rôle potentiel de l'aspirine et d'autres AINS dans la chimoprévention des cancers a été montré dans plusieurs études (Taketo, 1998 ; Ziegler, 1998). Des études épidémiologiques ont pu mettre en évidence que l'utilisation de l'aspirine ou d'autres AINS pouvait réduire de 40 à 50% le risque de cancer colorectal (Thun et coll, 1991 ; Thun et coll, 1993 ; Scheinmachers et Everson, 1994 ; Giovannucci et coll, 1995), et dans une plus faible mesure, le risque de cancer du sein (Scheinmachers et coll, 1994 ; Harris et coll, 1996). De même, l'inhibition de COX-2 par des AINS tels que l'aspirine, pourrait induire la régression des polypes au niveau du colon chez des patients atteints de polyadénomatose rectocolique familiale (Giardiello et coll, 1993).

L'aspirine retarderait la prolifération des cellules de cancer colorectal chez l'homme en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et la mort programmée des cellules (Elder et coll, 1996), comme ce qui est observé avec la majorité des agents de prévention du cancer (curcumin et indole-3 carbinol ; Samaha et coll, 1997 ; Cover et coll, 1998). Même si les premiers résultats de phase II sur des patients avec un adénome du colon sont encourageants (Barnes et coll, 1999), il n'existe pas d'études prospectives de l'incidence du cancer colorectal chez les patients prenant de l'aspirine ou d'autres AINS. Les premières études de phase III avec l'aspirine et les AINS sont actuellement en cours (Sharma et coll, 2001).

L'inhibition de COX-2 est l'une des cibles biochimiques de la prévention du cancer colorectal (Eberhardt et coll, 1994). En effet, le célécoxib inhibe l'incidence et la multiplication des tumeurs dans un modèle de carcinogénèse expérimentale dans le colon de rat. Le célécoxib est non seulement capable d'inhiber la croissance d'une tumeur primaire, mais aussi a un fort impact sur le développement des métastases (Myers et coll, 2001). Il pourrait exercer ces effets par l'intermédiaire d'un effet anti-angiogénique. De plus, le célécoxib s'est montré efficace dans des modèles expérimentaux chez la souris et le rat, alors que le SC 560, inhibiteur sélectif de COX-1, est resté sans effet. Le célécoxib arrête la croissance des cellules d'adénocarcinome de colon exprimant COX-2, *in vitro* et chez des souris nude. Par contre il est sans effet sur des cellules d'adénocarcinome n'exprimant pas COX-2 (Sheng et coll, 1998).

L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 permet d'induire l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, dont certaines cellules de cancer du colon (Hara et coll, 1997 ; Sheng et coll, 1998 ; Erickson et coll, 1999), d'estomac (Sawaoka et coll, 1998), de la prostate (Liu et coll, 1998) et du sein. Des travaux récents (Hsu et coll, 2000) ont montré que le célécoxib était capable d'induire l'apoptose dans des cellules humaines de cancer de la prostate en bloquant

la kinase anti-apoptotique Akt ou protéine kinase B, contrairement aux autres inhibiteurs de COX-2 qui inhibent Bcl-2 (Piazza et coll, 1995 ; Hanif et coll, 1996 ; Thompson et coll, 1997). Dans cette étude, il a d'ailleurs été possible de constater que le célécoxib a des potentialités inductrices d'apoptose beaucoup plus importantes que les autres inhibiteurs de COX-2 étudiés (rofécoxib).

Un mécanisme par lequel les AINS induisent la carcinogenèse est l'inhibition des facteurs de transcription nucléaire de type NF- κ B ou l'inhibition de la liaison du PPAR γ à l'ADN (He et coll, 1999).

II.6.5. Cartilage

Les effets des AINS sur les chondrocytes et globalement sur le cartilage sont controversés. Plusieurs travaux ont suggéré des effets bénéfiques sur le cartilage, alors que d'autres ont montré que certains AINS étaient responsables de l'aggravation des lésions du cartilage *in vitro* dans des modèles expérimentaux animaux et humains (Brandt et coll, 1987 ; Pelletier et coll, 1993 ; Rashad et coll, 1989). Les expériences utilisant des échantillons de cartilage âgé prélevé au niveau des têtes fémorales montrent que l'indométacine et les sodium salicylates suppriment l'activité de synthèse des chondrocytes (McKenzie et coll, 1976). Il n'existe pas encore de preuves concernant la sélectivité d'inhibition des AINS sur les COXs qui pourraient expliquer les différents effets de ces molécules sur le cartilage articulaire humain.

La grande variété des effets des AINS sur le cartilage dépend en partie de l'origine des cellules (Pelletier et coll, 1989). Par exemple, dans les cultures primaires humaines, le naproxène et le diclofénac n'ont pas d'effet significatif sur la synthèse des glycosaminoglycanes (GAGs) ou sur la prolifération cellulaire, même à fortes doses, alors que l'ibuprofène à 10 μ g/ml stimule la synthèse des GAGs (Smith et coll, 1995). Mais dans les chondrocytes de lapin en culture secondaire, le diclofénac sodique, l'indométacine, le piroxicam, le naproxène, l'ibuprofène et l'acide salicylique, à fortes concentrations, inhibent la synthèse des GAGs (Bjelle et coll, 1991). Les effets des AINS sur la synthèse des protéoglycanes dans le cartilage arthrosique sont aussi différents que ceux observés dans le cartilage normal. Les études *in vivo* et *in vitro* ont montré que certains AINS pouvaient réduire la dégradation du cartilage humain arthrosique. Des concentrations thérapeutiques d'acide tiaprofénique réduisent de façon considérable le catabolisme des protéoglycanes en diminuant la synthèse des MMPs. Cet effet est au moins en partie, lié à l'inhibition de COX (Pelletier et coll, 1989). Au contraire, des études sur le cartilage normal n'ont montré aucun effet significatif sur le catabolisme du cartilage. Les différences observées selon les conditions expérimentales et selon les espèces peuvent être liées à un profil d'expression et à la modulation différente des COXs entre les cellules humaines et de lapin (Lyons-Giordano et coll, 1993) et aux différents niveaux d'expression de COX-2 entre le cartilage sain et arthrosique (Amin et coll, 1997).

II.6.6. Apoptose

Les AINS induisent l'apoptose dans des cellules en culture. Les lignées cellulaires humaines et de rongeur, de cellules épithéliales de colon, cancéreuses ou non (Hanif et coll, 1996 ; Piazza et coll, 1995 ; Tsuji et coll, 1995 ; Elder et coll, 1996 ; Lu et coll, 2001 ; Thompson et coll, 1997), les fibroblastes d'embryon de poulet transformés par *v-src* (Lu et coll, 1995) et les macrophages murins ont été montrés sensibles à l'apoptose induite par les AINS (AIA). Cependant certaines lignées se sont avérées résistantes à l'AIA.

L'aspirine ne cause pas d'apoptose, excepté à très forte dose (>1mM), où elle et son métabolite salicylé, agissent comme un inhibiteur compétitif de la COX (Elder et coll, 1996). Classiquement l'aspirine agit en tant qu'inhibiteur non compétitif de la COX, en acétylant la Ser530, bloquant partiellement la réaction de cyclooxygénation. Le fait que l'inhibition partielle de cette réaction par l'aspirine soit insuffisante pour induire l'apoptose, même si elle inhibe totalement la synthèse des PGs, suggère que la synthèse des PGs ne soit pas le mécanisme par lequel les AINS induisent l'apoptose.

L'apoptose induite par les AINS présente les mêmes caractéristiques biochimiques et la même séquence d'événements que les autres formes d'apoptose. Dans tous les types cellulaires étudiés, on a pu observer la fragmentation de l'ADN, la perte d'adhésion des cellules, les modifications du noyau et au cours des stades terminaux, le gonflement du cytoplasme et la formation des corps apoptotiques (Figure 25).

Plusieurs signaux de transduction ont été identifiés dans l'AIA. Ainsi, l'induction de *c-myc* apparaît indispensable pour l'AIA dans les fibroblastes embryonnaires de poulet. Ceci a été démontré par l'utilisation d'une sonde anti-sens qui permet l'inhibition de *c-myc* et par conséquent prévient l'AIA. Dans ce même type cellulaire, l'oncogène *v-src* potentialise l'AIA. De même, le proto-oncogène *bcl-2* régule directement l'AIA dans ces cellules, qui l'expriment normalement à un niveau faible. Dans ce cas, l'expression de *bcl-2* bloque l'AIA, comme cela a été montré dans des cellules humaines surexprimant *bcl-2* (utilisant un vecteur d'expression rétroviral) (Xie et coll, 1991).

Certains changements intervenant lors de l'AIA sont surprenant compte tenu des propriétés pharmacologiques des AINS et de leur pouvoir anti-néoplasique. En effet, les AINS agissant par compétition avec le substrat sont capables d'induire l'ARNm et la protéine de COX-2 (Lu et coll, 1995).

Le mécanisme de l'apoptose induite par les inhibiteurs de COX-2 reste inexpliqué. Cependant, dans les cellules cancéreuses de colon, le traitement par AINS induit l'augmentation de l'AA qui conduit à la synthèse de céramide, connue pour être inducteur de la mort cellulaire. Cette induction fait intervenir un sphingomyélinase (Chan et coll, 1998). Dans d'autres conditions, les inhibiteurs de COX-2, NS-398 et SC-58125, induisent l'apoptose dans les cellules du colon ou de la prostate en inhibant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Sheng et coll, 1998 ; Liu et coll, 1998). Enfin, un troisième mécanisme d'induction de l'AIA, indépendant de l'induction de COX-2, a été observé avec le sulfate de sulindac, métabolite du sulindac, dépourvu de toute potentialité inhibitrice sur COX-2 (Piazza et coll, 1995 ; Hanif et coll, 1996 ; Thompson et coll, 1997)

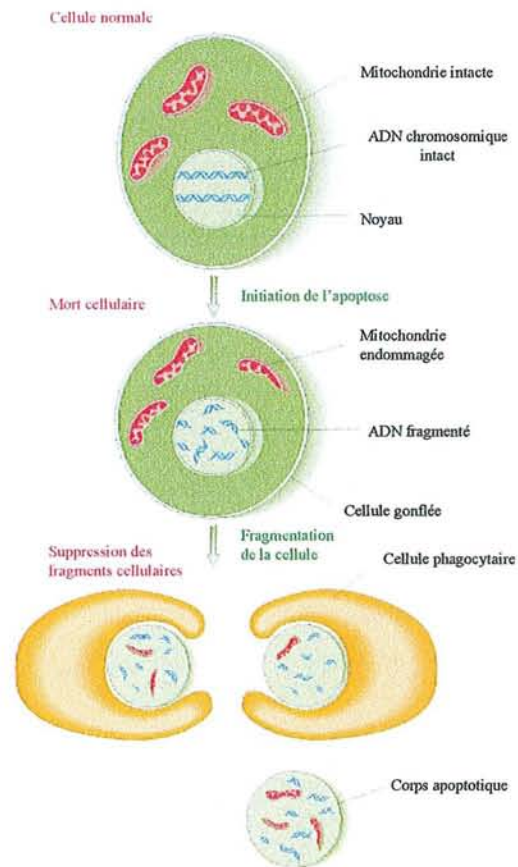


Figure 25 Représentation schématique de l'apoptose (d'après Anthony et coll, 1999)

II.7. Alternative au traitement par les inhibiteurs sélectifs de COX-2

Les résultats cliniques obtenus avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2, comme le célécoxib et le rofécoxib, sont prometteurs. Cependant, le développement d'inhibiteurs très sélectifs et leur utilisation en clinique pourrait entraîner des réactions critiques. Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 sont capables de réduire les risques d'effets secondaires gastro-intestinaux, mais COX-2 n'est pas seulement une enzyme pro-inflammatoire, elle possède également des propriétés physiologiques impliquant son expression constitutive (Katori et coll, 2000). Elle est notamment impliquée dans la régulation du système rénine-angiotensine (Morham et coll, 1995 ; Harris et coll, 1994) et elle possède des propriétés vaso-active et anti-athérogénique (Mitchell et Evans, 1998). Qui plus est, l'induction hormonale est importante pour l'ovulation et à la fin de la gestation, les taux élevés de COX-2 dans l'utérus sont indispensables pour l'induction du travail (Morham et coll, 1995 ; Chakraborty et coll, 1996). Le rôle de COX-2 dans la cicatrisation des ulcères a également été prouvé. Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 se positionnent plus que jamais, comme une alternative au paracétamol (ACR Guidelines, 2000). Cependant, aux doses thérapeutiques recommandées, ces molécules conservent leur sélectivité et n'ont aucun effet sur l'agrégation plaquettaire ou le temps de saignement. Ainsi, la tolérance des molécules doit être considérée en prenant en compte le bénéfice de l'inhibition sélective de COX-2. D'autres alternatives, comme des molécules anti-inflammatoires avec des effets secondaires gastro-intestinaux réduits, les NO-AINS ou les

inhibiteurs mixtes cyclooxygénase et 5-lipoxygénase (ML 3000) (Laufer et coll, 1997 ; Augustin et coll, 1994 ; Celotti et Laufer, 2001), sont intéressantes (Figure 26).

II.7.1. Inhibiteur mixte COX/LOX

L'inhibition mixte de la COX et de la LOX pourrait être un avantage, car les PGs favorisent l'inflammation médiée par le LTB₄ (Raud et coll, 1989 ; Hedqvist et coll, 1990). Des composés anti-inflammatoires sont efficaces sur l'influx cellulaire dans les périodes où les taux de LTB₄ sont réduits dans l'exudat (Kirchner et coll, 1997). L'inhibition des PGE₂ seules dans l'exudat ne peut être corrélée avec l'inhibition de l'influx cellulaire. En effet, l'idée est donc d'obtenir des composés ayant une activité anti-inflammatoire identique aux AINS classiques, tout en conservant la production des PGs gastroprotectrices et en supprimant les LTs bronchoconstricteurs.

Les inhibiteurs mixtes devaient être capables d'inhiber les deux enzymes, COXs et LOX, différentes d'un point de vue structural, dans une fourchette de concentrations raisonnable. Cependant, l'inhibition ne doit pas se prolonger de manière à éviter les effets indésirables liés à une inhibition chronique (Bertolini et coll, 2001).

L'inhibition mixte de la COX et de la LOX devrait permettre le traitement symptomatique de l'hyperalgésie et l'inhibition des infiltrations cellulaires conduisant aux lésions tissulaires sur le site de l'inflammation.

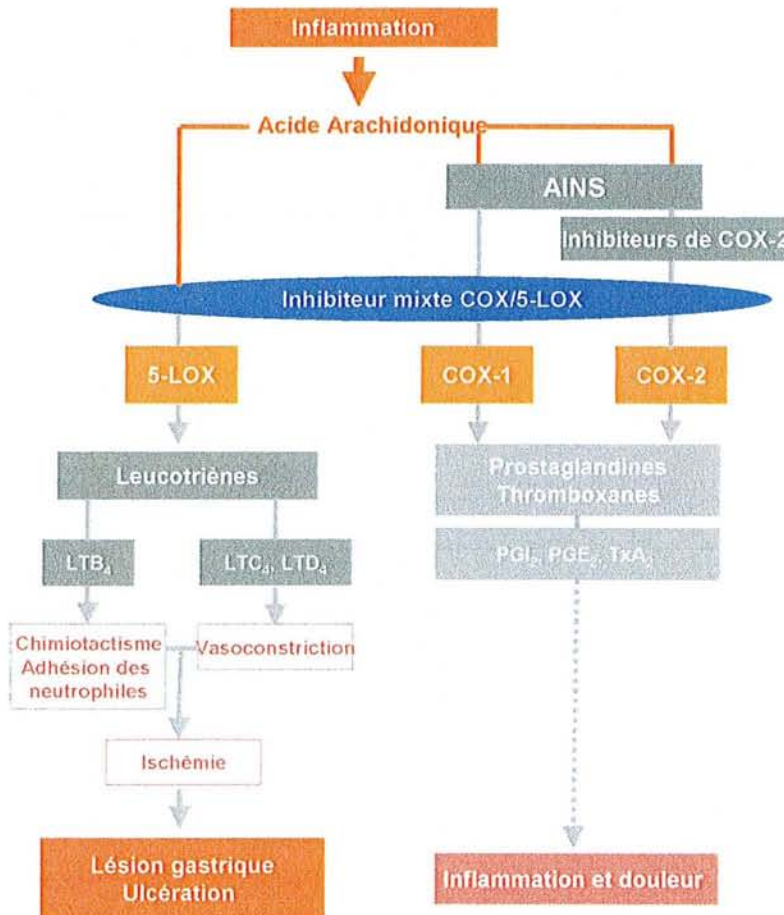


Figure 26 Cible de l'inhibition mixte COX/5-LOX

Le RWJ 63556 est un inhibiteur mixte COX-2/LOX. Il s'agit d'un composé aryl méthane sulfonamide, dérivé du nimésulide. Son efficacité a été démontrée dans un modèle d'inflammation chez le chien (Kirchner et coll, 1997), où il maintient ses propriétés anti-inflammatoires et d'inhibition du LTB₄ au cours des 24 heures de l'expérience.

Le ML-3000, acide [6-(4-chlorophényl)-2,2-diméthyl-7-phényl-2,3-dihydro-1H-pyrolizine-5-yl] acétique (Figure 27), est un composé pyrolizine polysubstitué, qui a été sélectionné à partir de résultats *in vitro* ayant montré un pouvoir inhibiteur équivalent pour la COX et la 5-LOX à des doses de l'ordre du micromolaire (Laufer et coll, 1994 et 1997) (Tableau 13).

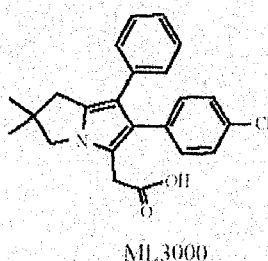


Figure 27 Structure chimique de l'inhibiteur mixte COX/5-LOX, ML-3000

Tableau 13 Pouvoirs inhibiteurs du ML-3000 sur la COX et la 5-LOX obtenus *in vitro* (d'après Laufer et coll, 1994)

	CI ₅₀ (μM)	
	COX	5-LOX
ML-3000	0,16-0,21	0,18-0,23

Les études *in vitro* ont été réalisées sur des plaquettes humaines et bovines pour tester le pouvoir inhibiteur sur l'activité COX et sur des granulocytes humains et bovins pour tester le pouvoir inhibiteur sur l'activité 5-LOX. L'inhibition de la 5-LOX a également été montrée sur des cellules basophiles de leucémie de rat. Les évaluations *ex vivo* de l'effet sur le LTB₄ ont été réalisées chez le rat.

Des études *in vivo* sur des veinules mésentériques de rat ont montré que le ML-3000 était capable de bloquer la voie de la 5-LOX. Les leucocytes de rat en présence de ML-3000 n'adhèrent pas aux veinules alors que le traitement par l'indométacine provoque leur adhérence.

Les propriétés pharmacologiques du ML-3000 ont été testées dans différents modèles expérimentaux (Tableau 14). Sa demi-vie d'élimination plasmatique est de 7 à 10 heures. Ainsi, une administration biquotidienne est recommandée.

La tolérance digestive du ML-3000 a été étudiée au cours de plusieurs études chez les animaux après des administrations uniques ou répétées. Il a été montré qu'il provoquait moins

d'irritations gastriques et duodénales, moins d'érosions ou d'ulcérations que les AINS classiques à des doses provoquant des effets pharmacodynamiques comparables. Chez le rat, les ulcérations ont été observées chez quelques rares animaux après l'administration de forte dose, alors que l'indométacine provoque des ulcérations dans 40% à 80 % des cas dans les mêmes conditions d'administration. De plus, les quelques ulcérations observées avec le ML-3000 étaient plus petites et moins sévères. La bonne tolérance gastro-intestinale de cette molécule a été confirmée dans plusieurs modèles animaux. Le ML-3000 n'empêche pas l'inhibition de synthèse des PGs au niveau de l'estomac, mais évite les lésions gastro-intestinales en empêchant l'adhérence des leucocytes aux veinules mésentériques (Wallace et coll, 1994).

Tableau 14 Modèles expérimentaux dans lesquels les propriétés pharmacologiques du ML-3000 ont été testées

Activité	Modèles expérimentaux
Anti-inflammatoire	Œdème de la patte à la carragénine Erythème sous UV (cobaye) Poche à air (rat) Arthrite à l'adjuvant (rat)
Analgésique	Randall et Sellito (rat)
Antipyrétique	Fièvre à la levure de bière (rat)
Antiasthmatique	Bronchoconstriction induite à l'AA et à l'antigène (cobaye) Asthme induit par l'antigène (mouton)
Antithrombotique	Effet anti-agrégant sur les plaquettes sanguines (humain et lapin) Thrombose induite au laser dans vaisseaux mésentériques (rat)

Le ML-3000 a été testé dans un essai randomisé, contrôlé, en double aveugle, comparé à un placebo, chez des patients porteurs d'arthrose du genou diagnostiquée radiographiquement et cliniquement. Le ML-3000 a été administré aux doses de 100 mg, 200 mg, 400 mg bid. L'efficacité du traitement a été évaluée par l'index WOMAC (Western Ontario and McMaster university Osteoarthritis Index) (Bellamy et coll, 1988 ; Bellamy, 1995). La valeur de l'index a été réduite de façon significative par les doses de 200 et 400 mg bid. Aucun effet significatif n'a été observé avec la dose de 100 mg bid ou avec le placebo.

Dans une autre étude, le ML-3000 (100, 200 ou 400 mg bid) a été comparé au diclofénac (50 mg tid). Dans cette étude, l'évaluation de l'index WOMAC a été faite séparément pour la douleur, la raideur et la fonction physique afin de déterminer un index global. Le ML-3000 a montré une grande efficacité sur la douleur au mouvement, au repos et la douleur arthrosique globale, comparé au placebo. Aucune différence significative n'a été observée entre le ML-3000 et le diclofénac 50 mg tid en terme d'efficacité.

Le ML-3000 est bien toléré après une administration unique ou répétée. Au cours d'une étude de tolérance, à des doses croissantes de ML-3000 allant jusqu'à 3200 mg chez des volontaires sains, la diarrhée a été le seul effet observé à partir de 1600 mg, aucune modification des

paramètres cliniques, comme la clairance de la créatinine et les paramètres de fonctionnement du foie, n'a été observée jusqu'à la dose de 3200 mg.

Aucun effet sévère n'a été reporté jusqu'à maintenant chez les patients utilisant le ML-3000.

Une étude endoscopique a été réalisée chez des volontaires sains de sexe masculin et féminin, recevant du ML-3000 (200 et 400 mg bid), du naproxène (500 mg bid) ou un placebo. Cette étude a confirmé la bonne tolérance digestive du ML-3000. En effet, aucune modification du score d'évaluation de la muqueuse digestive n'a été observée avec le ML-3000 aux deux doses testées, alors que le naproxène a provoqué une détérioration significative du score d'évaluation.

II.7.2. Paracétamol

Le paracétamol est de loin la molécule la plus utilisée dans le monde pour ses propriétés anti-pyrétique et antalgique. Cependant, ses effets anti-inflammatoires sont faibles. Même si les mécanismes d'action du paracétamol sur les COXs ne sont pas clairement établis, tout laisse supposer que les effets antalgique et anti-pyrétique du paracétamol sont dus à une inhibition des COXs au niveau central, c'est-à-dire au niveau du cerveau et de la moelle épinière, notamment au niveau de l'hypothalamus (Flower et Vane, 1972). Cependant, il est incapable d'inhiber, aux doses thérapeutiques, les COXs au niveau des tissus périphériques. Ceci pourrait expliquer ses faibles propriétés anti-inflammatoires (Schnitzer et coll, 1998).

Il a été montré que le paracétamol est l'un des facteurs capables de réduire COX-1 (Markey coll, 1987).

L'inhibition sélective de COX-2 par le rofécoxib permet de réduire la fièvre et la douleur (Chan et coll, 1999). Les études chez des souris dépourvues de COX-2, donc incapables de développer de la fièvre après une injection de LPS, ont permis de mettre en évidence un effet *in vivo* du paracétamol sûrement lié à COX-2 (Li et coll, 1999). De même, dans un modèle de douleur, le paracétamol est capable de réduire significativement la production de PGE₂ dans la moelle épinière (production attribuée à COX-2), mais est sans effet sur l'excrétion urinaire de PGE₂ (activité COX-1-dépendante) (Muth-Selbach et coll, 1999).

Des résultats publiés récemment (Ouellet et Percival, 2001) ont confirmé la sélectivité d'inhibition du paracétamol sur les COXs avec la détermination des CI₅₀ (doses inhibant 50% de l'activité enzymatique) sur des enzymes de COX-2 humaine et de COX-1 ovine, en présence d'AA. De plus, il a été montré que le paracétamol est d'autant plus actif sur les COXs, dans ces conditions expérimentales, que les taux de peroxyde sont faibles. Ceci est cohérent avec l'inhibition des COXs en cas de fièvre ou de douleur lorsque le niveau de peroxyde est faible (Hertz et Cloarec, 1984). De même, les faibles potentialités anti-inflammatoires du paracétamol pourraient être dues aux fortes concentrations en peroxydes au niveau périphérique.

Dans le système du sang total, le paracétamol a des potentialités d'inhibition faibles mais significatives sur les COXs avec une tendance plus prononcée pour l'inhibition de COX-2 (Brooks et coll, 1999). Ceci n'est pas une preuve des propriétés anti-inflammatoires de la molécule puisque cette activité peut être due à la faible teneur en peroxyde du système.

Le paracétamol administré à la dose de 4 g/j chez des patients atteints d'arthrose du genou avec des douleurs légères à modérées, s'est avéré plus efficace que le placebo et aussi efficace que l'ibuprofène (1,2 à 2,4 mg/j) (Shamoon et Hochberg, 2001). Tout ceci place le paracétamol comme une alternative aux AINS pour le traitement de la douleur chez les patients arthrosiques.

II.7.3. Modification des AINS classiques

La conversion des AINS classiques en inhibiteurs sélectifs de COX-2 constitue une autre alternative thérapeutique (Dannhardt et Laufer, 2000).

Les NO-AINS représentent une autre alternative et une nouvelle classe de dérivés d'AINS, générés par l'addition d'un groupement nitroxybutyl lié à la molécule parent (AINS) par une liaison éther (Elliott et coll, 1995 ; Wallace et coll, 1995; Fiorucci et coll, 1999a et b ; Moncada et Higgs, 1993). Ces molécules ont montré une réduction marquée de la toxicité gastro-intestinale tout en conservant l'activité anti-inflammatoire et anti-pyrétique de la molécule parent. Les NO-AINS sont capables d'inhiber la synthèse des PGs et exercent des propriétés anti-inflammatoire et anti-apoptotique remarquables. Des études chez l'animal ont montré que les NO-AINS étaient plus efficaces que les AINS conventionnels sur la réduction de l'inflammation et de la douleur chez le rat arthritique (Fiorucci et coll, 1999 ; Dimmeler et coll, 1997; Kim et coll, 1998). D'autres études ont mis en évidence le rôle des NO-AINS sur les caspases. Ils ont en effet, de la même manière que les donneurs de NO, la possibilité d'inhiber le processus apoptotique en provoquant la N-nitrosylation, donc l'inactivation d'effecteur tel que la caspase-3 (Kim et coll, 1998) ou le blocage de la sécrétion de certaines cytokines proinflammatoires en inhibant la caspase-1 ou ICE (enzyme de conversion de l'IL-1 β et de l'IL-18) (Fiorucci et coll, 2000). Ce mode d'action des NO-AINS constitue une potentialité anti-inflammatoire indépendante de COX-2.

Objectif du travail

Les AINS constituent l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées et restent le traitement symptomatique de première intention dans les pathologies articulaires, inflammatoires (arthrite) ou dégénératives (arthrose). Il est largement admis que leur principal mécanisme d'action consiste à inhiber la biosynthèse des PGs par la COX. Cependant, leur utilisation s'accompagne d'effets secondaires importants, notamment au niveau gastro-intestinal. La mise en évidence de deux isoformes de COX aux fonctions distinctes a permis de décrire des profils de sélectivité d'inhibition des deux isoformes de COX différents pour les AINS classiques (d'après des modèles d'étude cellulaires). Ceci a également permis d'émettre une hypothèse pouvant paraître simpliste : l'inhibition de COX-1, isoforme constitutive est délétère pour l'organisme alors que l'inhibition de COX-2, inductible notamment au cours de l'inflammation, serait bénéfique. COX-2 est donc devenue une cible thérapeutique de choix et de nouvelles molécules ont été développées avec des pouvoirs inhibiteurs de COX-1 très faibles (sélectivité pour COX-2), et par conséquent avec une tolérance digestive potentiellement améliorée.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes attachés à étudier la pertinence de la sélectivité d'inhibition des isoenzymes de la COX dans des modèles mimant des conditions cliniques d'utilisation des AINS, c'est-à-dire une administration orale répétée du médicament au cours du processus arthritique. Cette approche avait pour objectif d'étudier l'influence de la maladie arthritique sur la tolérance digestive aux AINS et de pouvoir mesurer les pouvoirs inhibiteurs des molécules dans les tissus cibles (contenus en PGE₂ de la muqueuse gastrique et des pattes arthritique, synthèse plaquettaire de TxB₂ ex vivo). La comparaison des propriétés pharmacologiques d'AINS classiques et d'inhibiteurs ayant une sélectivité accrue pour COX-2 a été entreprise à l'aide de paramètres d'évaluation classiques (score, œdème, IL-6 circulante) ou originaux (fièvre et activité locomotrice par biotélémétrie), en étudiant plus particulièrement leurs effets sur la biosynthèse des protéoglycannes du cartilage (incorporation de sulfate radiomarqué).

Dans cette première partie, nous avons choisi d'étudier les effets de trois molécules ayant, d'après les études in vitro, des profils de sélectivité différents : un inhibiteur préférentiel de COX-2, le Méloxicam, un inhibiteur sélectif de COX-2, le Célecoxib et un AINS comparateur non sélectif, le Naproxène. Ces molécules ont été étudiées dans un modèle de polyarthrite à l'adjuvant, choisi comme modèle représentatif d'une inflammation chronique et dans un modèle de monoarthrite au zymosan, choisi comme représentatif d'une inflammation aiguë.

L'arthrite à l'adjuvant (Philippe et coll, 1997), médiée par un processus dysimmunitaire dépendant des lymphocytes T, est un modèle expérimental de polyarthrite rhumatoïde qui est devenu un standard pour l'évaluation des AINS. En combinant l'évaluation de paramètres biologiques (cytokines pro-inflammatoires), métaboliques (anabolisme du cartilage) et biotélémétriques (fièvre et mobilité), il est possible de distinguer 4 phases successives dans ce modèle, dépendantes des processus inflammatoires locaux ou systémiques. Ainsi, après une sensibilisation locale des animaux par l'injection d'adjuvant

complet dans le coussinet plantaire, on observe successivement une réponse inflammatoire précoce (2 à 4 jours après la sensibilisation), une phase silencieuse (entre 5 et 9 jours après la sensibilisation), une phase dite immunologique, correspondant à l'extension du processus dysimmunitaire dans toutes les articulations (entre 10 et 15 jours après l'injection), puis une phase d'état de la polyarthrite débutant après 16 jours et généralement maximale à J21. Qui plus est, l'atteinte articulaire s'accompagne d'une baisse de la biosynthèse des protéoglycanes du cartilage articulaire.

L'arthrite au zymosan chez le rat (Gegout et coll, 1995) associe une phase inflammatoire précoce prostaglandine-dépendante, comprenant l'œdème, la fièvre et l'hyperalgie, et des modifications de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage proches de celles induites par l'IL-1. Ainsi, après une injection de zymosan dans l'articulation du genou, une réponse fébrile et un œdème articulaire sont observés pendant 24 heures. Ces changements s'accompagnent d'une diminution précoce de l'activité locomotrice (un jour après l'injection) avec un retour progressif à la normale à 4 jours. Parallèlement, la synthèse des protéoglycanes du cartilage patellaire montre une variation biphasique avec une inhibition initiale (J1-J2) et une stimulation secondaire (J4-J5).

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes attachés à étudier les conséquences d'une inhibition plus ou moins sélective de la COX sur le cartilage articulaire dans des modèles expérimentaux d'arthrose. Cette approche avait pour objectif d'étudier les effets d'une inhibition sélective de COX-2 ou d'une inhibition mixte COX/5-LOX sur la sévérité des lésions arthrosiques, en considérant plus particulièrement l'apoptose chondrocytaire (Tunel et caspase-3 active) et les modifications métaboliques du cartilage (biosynthèse des protéoglycanes). En effet, d'une part, l'apoptose chondrocytaire est un des mécanismes étiopathogéniques supposé de l'arthrose (Kim et coll, 2000 ; Hashimoto et coll, 1998) et la mort cellulaire programmée est modulée par les AINS dans d'autres tissus (Taketo et coll, 1998 ; Liu et coll, 2001). D'autre part, les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (Silverstein et coll, 2000 ; Bombardier et coll, 2000) et les inhibiteurs mixtes COX/5-LOX (Wallace et coll, 1994) ayant une tolérance digestive améliorée, sont susceptibles d'être administrés au long cours chez des patients arthrosiques, en se positionnant comme une alternative au paracétamol (ACR OA guidelines, 2000).

Dans cette seconde partie, nous avons donc comparé l'impact du Rofécoxib, inhibiteur sélectif de COX-2 et du Naproxène, AINS comparateur non sélectif, et effectué une étude dose-réponse avec la Licofélone (ML-3000), inhibiteur mixte COX/5-LOX. Ces études ont été réalisées respectivement dans deux modèles expérimentaux mimant des aspects différents de l'arthrose humaine : l'arthrose induite par l'injection intra-articulaire de minoiiodoacétate (MIA) chez le rat et l'arthrose induite par la section du ligament croisé antérieur (LCA) chez le chien.

L'injection intra-articulaire de MIA chez le rat, adapté du modèle de Kalbhen (Guingamp et coll, 1997 ; Kalbhen, 1987) est un modèle d'arthrose par altération du métabolisme chondrocytaire, générant des modifications structurales du cartilage de l'articulation du genou. Les altérations structurales du cartilage, caractéristiques de la

pathologie humaine (ostéophytose, mise à nu de l'os sous-chondral), se développent en 2 à 3 semaines dans ce modèle. Ce modèle est caractérisé par l'absence d'une composante inflammatoire marquée et pourrait mimer les phases précoces du processus arthrosique, visibles à partir de 10 jours après l'injection de MIA. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier les conséquences de l'inhibition sélective de COX-2 par le Rofécoxib sur le cartilage 10, 15 et 20 jours après l'injection de MIA.

La section ligamentaire chez le chien est un modèle d'arthrose par instabilité articulaire, adapté du modèle de Pond-Nuki (Pond et Nuki, 1973 ; Pelletier et coll, 1999) générant des contraintes biomécaniques anormales dans l'articulation du genou. Ceci conduit à un processus dégénératif lent et progressif du cartilage, associé à une composante inflammatoire précoce (synovite) et consécutive à l'acte chirurgical (Pelletier et coll, 2000 et 2001). C'est pour cette raison que nous avons étudié les conséquences articulaires tardives du traitement chronique (8 semaines) par le ML-3000 et que nous avons évalué l'expression de protéines précoces de la réaction inflammatoire (iNOS et COX-2).

***Etude expérimentale
1ère partie***

***Mise en évidence de la sélectivité
d'inhibition des COXs in vivo-
Etude du Méloxicam***

I. MATERIEL ET METHODE

I. Animaux et traitements

I.1. Animalerie

Les rats Lewis mâles (Charles River France) pesant 150 à 200 g sont placés dans des cages par groupe de trois avec nourriture et boisson à volonté. Ils sont hébergés dans une animalerie ventilée et thermorégulée à 24±1°C, bénéficiant de cycles de 12 heures d'éclairage et 12 heures d'obscurité. Les animaux sont acclimatés au moins 5 jours au laboratoire avant toute expérimentation.

I.2. Induction de l'arthrite

L'arthrite est induite par l'injection sous-cutanée dans le coussinet plantaire de la patte arrière droite de 1 mg d'adjuvant complet de Freund (ACF) sous un volume de 100 µl. Le jour de l'injection est arbitrairement désigné comme J0.

L'émulsion d'ACF est préparée à partir d'une souche de *Mycobacterium tuberculosis H37RA* (Difco Laboratories, USA) dispersée dans un mélange de sérum physiologique (Braun Fandre, France) (45%, v/v), d'huile de vaseline (Prolabo, France) (45%, v/v) et de Tween 80 (polyoxyéthylène-sorbitan monooléate) (10%, v/v) pour obtenir une concentration finale de 10 mg/ml.

I.3. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont préparés dans une solution aqueuse à 1% (p/v) de carboxyméthylcellulose (CMC) (Prolabo, France). Ils sont administrés par gavage, à l'aide d'une sonde gastrique, à raison de 1 ml de suspension pour 100 g de poids corporel. Le traitement débute le jour de l'induction de l'arthrite (J0). Quatre doses de méloxicam (0,1-0,3-1-3 mg/kg/j) (Boehringer Ingelheim, France) et trois doses de naproxène (3-10-30 mg/kg/j) (Sigma) sont administrées en prise quotidienne unique pour le méloxicam et en deux prises quotidiennes pour le naproxène. Les animaux traités par le méloxicam reçoivent de la CMC 1% lors de la deuxième administration quotidienne de naproxène de façon à ce que les animaux soient manipulés le même nombre de fois (influence possible du stress sur la sévérité de la polyarthrite). Les animaux témoins, induits par l'ACF, reçoivent de la CMC à 1% deux fois par jour.

II. Evaluation de la sévérité de la réaction inflammatoire

II. 1. Biotélémetrie

La télémetrie est une technologie reposant sur le transfert d'information sous la forme d'ondes radio entre un système émetteur placé dans la cavité péritonéale de l'animal et un

système récepteur (antenne en T) placé sous la cage de l'animal (Figure 28). Les informations sont ensuite intégrées, centralisées puis enregistrées toutes les heures par un système informatique en vue de leur analyse. L'unité télémétrique utilisée est de type Mini Mitter (Sunriver, Oregon, USA) et elle permet la mesure en continu de paramètres dépendants de la sévérité de la réaction inflammatoire tels que la mobilité et la température corporelle chez le rat :

- l'émetteur comprend une thermistance dont la fréquence d'émission varie avec la température corporelle
- tout déplacement de l'animal génère une impulsion par modification de la distance de réception.

Les rats Lewis mâles (Charles River, France) de 150 à 175 g sont placés individuellement dans des cages avec nourriture et boisson à volonté dans une animalerie thermorégulée $24 \pm 1^\circ\text{C}$ et avec des cycles d'éclairage de 12 heures. Un émetteur est implanté dans la cavité péritonéale de chaque animal cinq jours avant l'induction de l'arthrite. Chaque groupe comprend 5 animaux qui sont traités comme décrit précédemment.

Ce système permet de tracer des courbes de température et de mobilité moyennes sur 12 heures exprimées en pourcentage de variation par rapport au jour de référence (J0). On peut alors calculer les aires sous la courbe (AUC) correspondant à chaque dose de médicament et ensuite exprimer l'AUC en pourcentage du témoin arthritique. Nous pouvons déterminer pour chaque AINS, la $DI_{-1,0^\circ\text{C}}$ pour la température (dose faisant baisser la fièvre de $1,0^\circ\text{C}$) et la DE_{20} pour la mobilité (dose corrigeant 20% de la perte d'activité) par une analyse de régression linéaire simple après transformation semi-logarithmique.

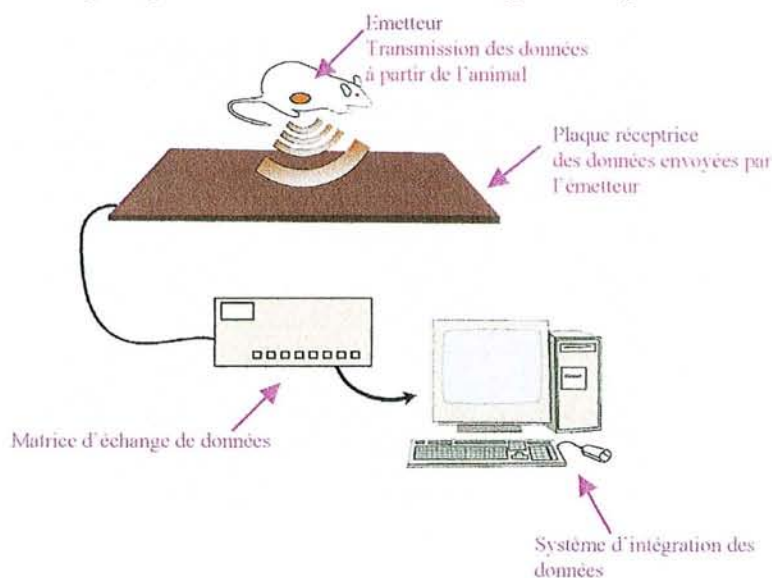


Figure 28 Représentation schématique de la biotélémétrie

II. 2. Autres paramètres

Les animaux sont évalués au 1^{er} jour de traitement (J0) ainsi que 2, 7, 12, 16 et 21 jours après l'induction. Les animaux sont sacrifiés à ces temps, sous anesthésie générale par

un mélange de kétamine 5% (Imalgène®, Rhône Mérieux, France) et d'acépromazine 0,5% (Vetranquil®, Sanofi, France) injecté par voie intra-péritonéale sous un volume de 100 µl pour 100g de poids corporel.

- La pesée régulière est effectuée à l'aide d'une balance précise au g près et elle permet de contrôler indirectement l'efficacité (correction de la perte de poids secondaire à la polyarthrite) et/ou la toxicité (aggravation de la perte de poids) des molécules testées.
- Le score de sévérité correspond à une évaluation semi-quantitative réalisée en simple insu par le même expérimentateur. Une note variant de 0 (patte normale) à 4 (troubles trophiques majeurs) détermine la sévérité et l'étendue de la rougeur et l'œdème des tissus périarticulaires. La somme des scores des trois pattes non induites reflète la progression et la sévérité de la maladie.
- Les volumes des pattes arrières qui sont un reflet de l'œdème, sont mesurées à l'aide d'un pléthysmomètre à eau (modèle 7150, Apelex, France). Les volumes mesurés sont comparés aux valeurs initiales chez les mêmes animaux et ces différences sont ensuite exprimées en pourcentage de l'œdème par rapport aux témoins arthritiques. Les doses inhibant 50 % de l'œdème (DI₅₀) sont ensuite déterminées sur la patte controlatérale pendant la phase secondaire de l'arthrite par une analyse de régression linéaire simple après transformation semi-logarithmique.
- L'arthrite par adjuvant est la conséquence d'une réponse immunologique aux antigènes bactériens contenus dans l'ACF et s'accompagne donc de processus dysimmunitaires (involution thymique et splénomégalie). L'effet des traitements sur ces réactions est également un indicateur de leur efficacité. Les organes lymphoïdes (rate et thymus) sont prélevés à chaque temps intermédiaire (J2, J7, J12, J16 et J21) et pesés dans des tubes préтарés. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux rats sains.

IV. Etude de la biosynthèse des protéoglycanes du cartilage patellaire

L'anabolisme du cartilage au cours de l'inflammation articulaire est étudié par l'incorporation d'un précurseur radiomarké ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$) dans les glycosaminoglycanes. Comme les glycosaminoglycanes représentent la majorité des molécules sulfatées présentes dans le cartilage, l'incorporation de sulfate radiomarké est un indicateur très sensible de l'anabolisme du cartilage.

Les rotules droite et gauche sont disséquées au scalpel puis placées immédiatement dans du milieu RPMI 1640 Hepes (Gibco BRL, France) additionné de 100 UI/ml de pénicilline et de 100 µg/ml de streptomycine (Gibco BRL, France) et de 2mM de L-glutamine (Gibco BRL, France). Elles sont ensuite incubées pendant 3 heures dans 1 ml de milieu contenant 0,8 µCi de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (Amersham, France) à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO_2 . Au terme de cette incubation, les rotules sont lavées à 5 reprises dans 2,5 ml de sérum physiologique à +4°C puis placées dans du formol tamponné à 10 % (Surgipath) additionné de 0,5% de chlorure de cétypyridinium (Sigma, France) pendant une nuit, afin d'éliminer la radioactivité non-spécifique. Les rotules sont ensuite décalcifiées dans 1 ml d'acide formique (Sigma, France) à 5% pendant 8 heures, ce qui permet de réaliser ultérieurement des biopsies de 2 mm de diamètre à l'aide d'un emporte-pièce (Stiefel, France). Le centre de la rotule et sa

périphérie sont ensuite dissous dans 0,5 ml de solvène-350 (Packard, France) à 37°C pendant une nuit. Le comptage est alors effectué dans 4,5 ml de liquide scintillant (Hionic Fluor, Packard, France) par un compteur à scintillation liquide (1214 Rackbeta, LKB Wallac).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'incorporation du précurseur radiomarké dans le cartilage articulaire pathologique (animal arthritique) par rapport au cartilage sain (témoins absolus).

V. Evaluation de la production des eicosanoïdes par les cellules sanguines

Le sang est prélevé par ponction intra-cardiaque sous anesthésie générale, puis réparti en différentes aliquotes. Une partie du sang est recueillie sur tube sec puis incubée une heure à 37°C pour permettre la coagulation spontanée. La production de TxB_2 produit par les plaquettes sous l'effet de la thrombine au cours de la coagulation est un bon reflet de l'activité de COX-1. L'autre partie est recueillie sur anticoagulant (40 U/ml finale d'héparine (Panpharma)) et pré-incubées pendant 15 minutes à 37°C en présence d'aspirine (10 $\mu\text{g/ml}$ finale) (Sigma). Ces aliquotes sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C avec ou sans stimulation par du lipopolysaccharide (LPS) (10 $\mu\text{g/ml}$ reconstitué dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) 0,5 %) (Sigma). Le plasma est ensuite recueilli après centrifugation 5 minutes à 3000 tours par minute. Le dosage des PGE_2 produites majoritairement par les leucocytes est un bon reflet de la contribution de COX-2 (isoforme inductible).

De cette manière, nous pouvons déterminer la contribution des deux isoformes circulantes de la cyclooxygénase au cours du processus inflammatoire et mesurer la sélectivité d'inhibition des traitements.

Les dosages de PGE_2 et de TxB_2 sont réalisés par une méthode immunoenzymatique en microplaque 96 puits (Assay correlate, Assay Design, Ann Arbor, USA) de type ELISA compétition. Ces dosages utilisent un anticorps monoclonal de souris anti- PGE_2 ou un anticorps polyclonal de lapin anti- TxB_2 adsorbés sur les parois des puits. Les eicosanoïdes présents dans les échantillons vont entrer en compétition avec un conjugué PGE_2 ou TxB_2 marqué à la phosphatase alcaline, vis à vis des sites de fixation. Les gammes d'étalonnage de 0,04 à 5 ng/ml pour les PGE_2 et de 0,8 à 10 ng/ml pour le TxB_2 sont réalisées à partir de solutions standard à 50 ng/ml pour les PGE_2 et à 100 ng/ml pour le TxB_2 . Les échantillons sont dosés après dilution appropriée dans le tampon de dosage (1/10). L'absorbance est lue à $\lambda=405$ vs 630 nm contre un blanc réactif à l'aide d'un lecteur de microplaque (Dynatech MR 5000, Guyancourt, France) piloté par un micro-ordinateur Packard Bell sous le logiciel RMS (Dynatech, Guyancourt, France).

Les résultats sont exprimés en AUC rapportées à la valeur des témoins arthritiques et les valeurs de DI_{50} (dose inhibant 50 % de la production de prostaglandines) sont déterminées par régression linéaire simple après transformation semi-logarithmique.

VI. Etude de la production des prostaglandines dans les pattes inflammatoires

Les pattes arrières sont prélevées immédiatement après sacrifice puis congelées dans l'azote liquide après avoir enlevé la peau et les ongles. Elles sont ensuite pulvérisées dans l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à congélation (Spex, Freezer Mill, Bioblock, France) et conservées à -80°C jusqu'à extraction.

Les prostaglandines sont extraites selon le protocole suivant (adapté de Anderson et coll, 1996) :

- homogénéisation de 0.5g de tissu dans 1 ml de méthanol dans un poter
- ajustement à une concentration finale de 10% de méthanol par ajout de 9 ml d'eau distillée
- nouvelle homogénéisation au poter
- élimination des débris cellulaires par une décantation sur glace pendant 20 minutes
- centrifugation pendant 20 minutes à 5000g à 4°C.

Le surnageant est ensuite passé sur une colonne C18 SepPak (Waters) préalablement conditionnée par 2 ml de méthanol puis par 2 ml d'eau. Les prostaglandines sont éluées après 3 lavages successifs (H₂O, méthanol puis éther de pétrole) par du méthyl formate. L'éluant est évaporé sous flux d'azote, puis l'échantillon est repris dans du tampon de dosage (500 µl) et conservés à -80°C jusqu'au dosage.

Les résultats sont exprimés en quantité de PGE₂ extraites par g de tissu.

VII. Etude du contenu gastrique en prostaglandines

Lors du sacrifice, l'estomac est prélevé, ouvert selon la grande courbure et rincé dans 35 ml de sérum physiologique. Des biopsies de 6 mm de diamètre de la partie non-glandulaire de l'estomac (antre) sont ensuite effectuées à l'aide d'un emporte-pièce (Stiefel, France). Les biopsies sont ensuite broyées dans 500 µl de tampon HBSS (Gibco BRL, France) à +4°C à l'aide d'un ultra-turrax (Bioblock, France).

Le dosage des PGE₂ est réalisé par la méthode immunoenzymatique décrite précédemment après élimination des broyats par une centrifugation (voir paragraphe V). Les résultats sont exprimés soit en AUC rapportée à la valeur des témoins ACF (mesure du pouvoir inhibiteur global), soit en DI₅₀ (dose inhibant 50 % de la production de prostaglandines) déterminées aux différents temps de sacrifice par régression linéaire simple après transformation semi-logarithmique.

VIII. Dosage sérique de l'interleukine-6

Les taux sériques d'IL-6 sont déterminés à différents temps de la polyarthrite (J2, J7, J12, J16 et J21). Le sang des animaux est prélevé par ponction intracardiaque. Après centrifugation, les sérums sont conservés à -80°C jusqu'au dosage.

Le dosage de l'IL-6 est réalisé par une méthode biologique utilisant l'hybridome murin 7TD1 (Van Snick, 1989). 5.10³ cellules sont déposées sous un volume de 100 µl dans tous les puits de plaque 96 puits contenant 100 µl d'échantillon (8 dilutions de raison 2 par échantillon). Les cellules sont incubées 72 heures à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. La prolifération cellulaire est ensuite mesurée après addition de 25 µl d'une solution à 5 mg/ml de MTT et

après une incubation de 4 heures à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. Les cristaux bleus de formazan formés (activité des deshydrogénases mitochondriales) sont lysés par addition de 100 µl de tampon SDS-DMF (20/50, p/v). La lecture des densités optiques est effectuée à 580 nm *vs* 630 nm après une nouvelle incubation de 24 heures à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

Les taux d'IL-6 sont déterminés par comparaison à une gamme d'IL-6 recombinante humaine, une unité d'IL-6 provoquant 50% de prolifération dans le type cellulaire considéré.

IX. Analyse statistique

Les résultats ont été comparés par l'analyse des variances à l'aide du logiciel super ANOVA (Abacus Concept Inc., Berkeley, CA) suivie du test S de Scheffé. Les paramètres suivis au long cours (poids, volume de patte) ont bénéficié d'une analyse sur valeurs appariées alors que ceux mesurés aux différents temps de sacrifice (PGE₂ dans la muqueuse digestive, TxB₂ dans le sérum, anabolisme du cartilage patellaire et poids de la rate et du thymus) ont bénéficié d'une analyse sur valeurs non appariées. Le score de sévérité de l'arthrite étant une valeur semi-quantitative, son analyse a été effectuée à l'aide de tests non paramétriques. Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne ± écart type centré sur la moyenne (m ± sem). Le seuil de significativité a été choisi à 5 %.

RESULTATS

I. Comparaison des effets anti-inflammatoires des molécules

I.1. Evolution de la masse pondérale et du score clinique

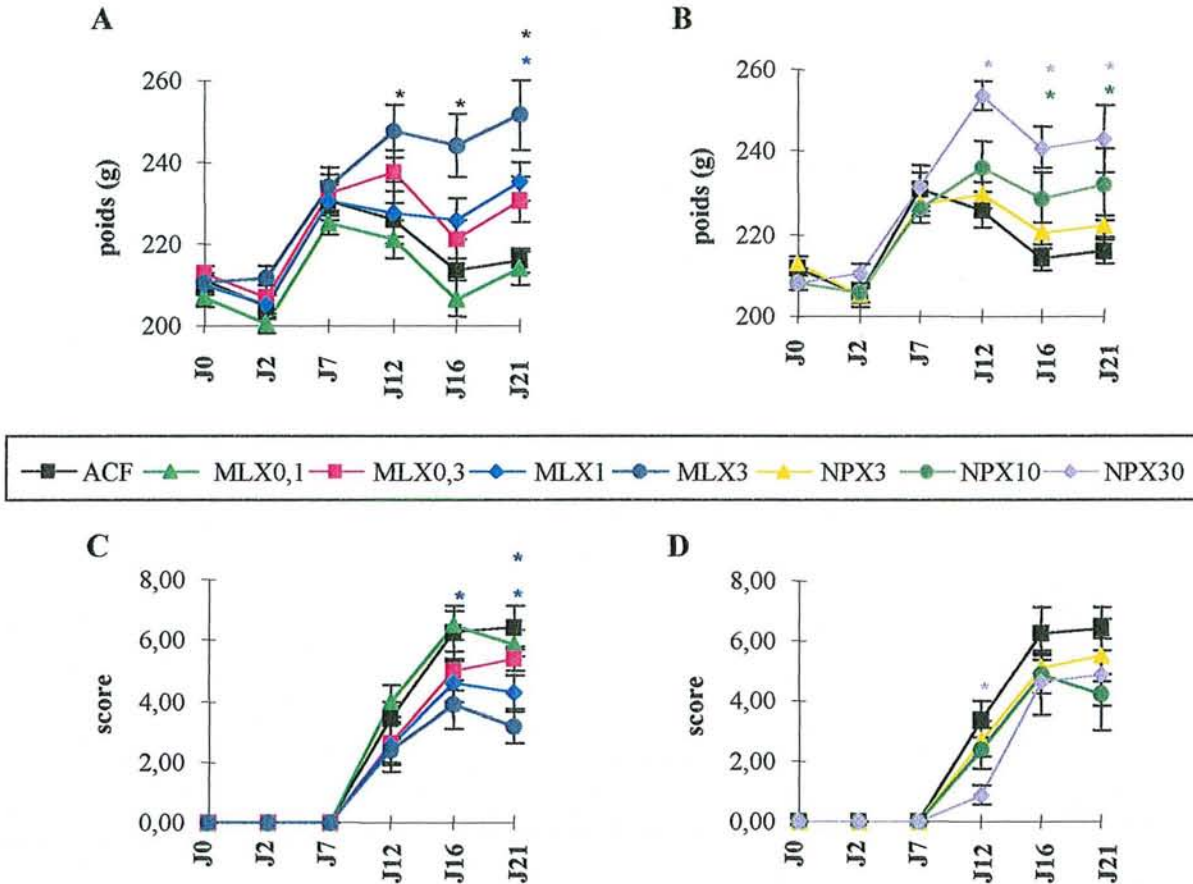


Figure 29 Evolution du poids et du score clinique au cours de la polyarthrite sous l'effet du méloxicam (A et C) et du naproxène (B et D) (ACF = témoins arthritiques, MLX0,1 = méloxicam 0,1 mg/kg/j, MLX0,3 = méloxicam 0,3 mg/kg/j, MLX1 = méloxicam 1mg/kg/j, MLX3 = méloxicam 3 mg/kg/j, NPX3 = naproxène 3 mg/kg/j, NPX10 = naproxène 10 mg/kg/j, NPX30 = 30 mg/kg/j) (n = 8 animaux par lot) (* : p < 0,05 /témoins ACF)

Les rats arthritiques ont un arrêt de leur courbe pondérale à partir du 7^{ème} jour après l'injection d'ACF (Figure 29 A et B). Par comparaison aux courbes pondérales standard pour des rats sains cela correspond à une perte de gain de poids variant d'environ 40 g à J12 à environ 70 g à J21. Ce blocage pondéral est contingent de la maladie (débutant lors de l'installation de la polyarthrite) et semble d'autant plus marqué que la polyarthrite est sévère (maximal à partir de J16).

La tolérance globale des traitements a été bonne, y compris aux fortes concentrations testées (méloxicam 3 mg/kg/j, naproxène 30 mg/kg/j) et aucune perte de poids supplémentaire n'a été observée chez les animaux arthritiques. Au contraire, les animaux traités par AINS ont une croissance pondérale montrant une correction partielle de cet effet. La correction observée est dépendante de la dose.

Le score clinique permet d'évaluer la sévérité de l'atteinte arthritique. Le score des 3 pattes non-injectées permet de suivre la progression de l'atteinte polyarticulaire. Ce critère est plus informatif que la mesure de l'œdème puisqu'il prend en compte le nombre d'articulations atteintes, y compris les pattes antérieures, ce qui le rapproche des indices articulaires utilisés chez l'homme dans la polyarthrite rhumatoïde (indice de Ritchie par exemple). L'observation de la progression du score clinique sur les pattes non induites (patte postérieure controlatérale et pattes antérieures) montre que la polyarthrite s'installe entre le 7^{ème} et le 12^{ème} jour puis s'étend progressivement pour atteindre l'ensemble des articulations distales (Figure 29 C et D). A partir du 16^{ème} jour, l'incidence de la polyarthrite est de 100 % dans tous les lots. Le méloxicam et le naproxène ne retardent pas l'apparition de la maladie, mais diminuent sa sévérité avec un effet dose-dépendant pour le méloxicam à J21. L'effet devient significatif à partir de 0,3 mg/kg/j pour le méloxicam dès J12, et à partir de 10 mg/kg/j pour le naproxène. L'efficacité thérapeutique des deux AINS semble présenter un profil quelque peu différent car le méloxicam paraît plus efficace au stade tardif (J21) alors que le naproxène semble efficace dès le début de la polyarthrite.

1.2. Effet anti-œdémateux

La mesure de l'œdème des pattes postérieures montre une réaction inflammatoire précoce (J2) dans la patte injectée (Figure 30 A et B), puis une réaction inflammatoire secondaire (J12) qui est contingente de l'apparition de l'œdème sur la patte controlatérale (Figure 30 C et D). L'effet anti-inflammatoire des molécules est particulièrement visible sur l'œdème des pattes postérieures non-injectées, qui est un marqueur du processus polyarthritique. La sévérité est maximale à J21 sur les deux pattes. Les deux AINS inhibent significativement l'œdème dès J2 sur la patte injectée et à partir de J12 sur la patte non injectée. L'effet semble dose-dépendant pour le méloxicam. Les CI_{50} calculées à J21 sont de 0,24 mg/kg/j pour le méloxicam et de 7,34 mg/kg/j pour le naproxène.

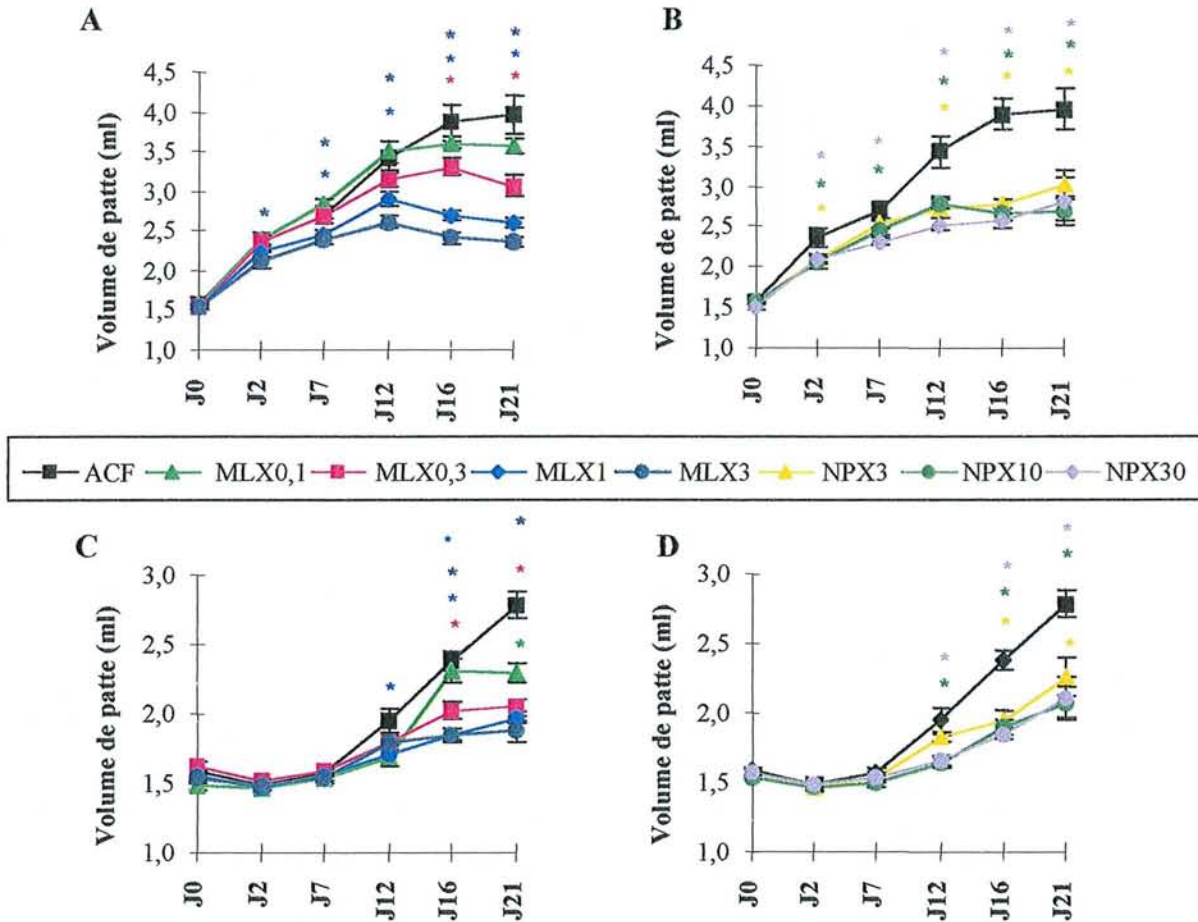


Figure 30 Evolution des volumes des pattes injectées (A et B) et non-injectées (C et D) au cours de l'arthrite à l'adjuvant et sous l'effet de deux AINS à différentes doses (n = 8 animaux par lot) (* : p < 0,05 /témoins ACF).

1.3. Réduction du handicap fonctionnel

Les rats ayant un rythme nyctéméral bien défini avec une période d'activité nocturne, nous avons étudié l'influence des AINS sur la mobilité pendant les phases d'obscurité.

La mobilité est représentée en pourcentage par rapport à l'activité de la nuit de référence (J0) (Figure 31).

Les rats arthritiques présentent une hypomobilité initiale, maximale à J1 qui se corrige partiellement jusqu'à J7. A partir de J8, les animaux ont une seconde phase d'hypomobilité qui s'accroît progressivement pour être maximale entre J16 et J21 (Figure 31). Ces deux phases d'hypomobilité coïncident avec les deux pics fébriles et traduisent probablement l'inflammation et/ou la douleur locale associée à la sensibilisation puis l'atteinte polyarthritique d'origine immunologique. L'effet des AINS reste modéré sur ce paramètre avec un effet non significatif sur l'hypomobilité initiale. Nous avons choisi comme critère d'efficacité des médicaments, la correction de 20 % de l'hypomobilité. Sur ce critère, l'analyse des AUC montre que les doses efficaces sont supérieures aux doses testées entre J1 et J4 pour le méloxicam et que la DI_{20} est de 21,56 mg/kg/j pour le naproxène. En revanche,

sur l'hypomobilité secondaire, les doses efficaces (DI₂₀) sont de 1,68 mg/kg/j pour le méloxicam et de 4,66 mg/kg/j pour le naproxène.

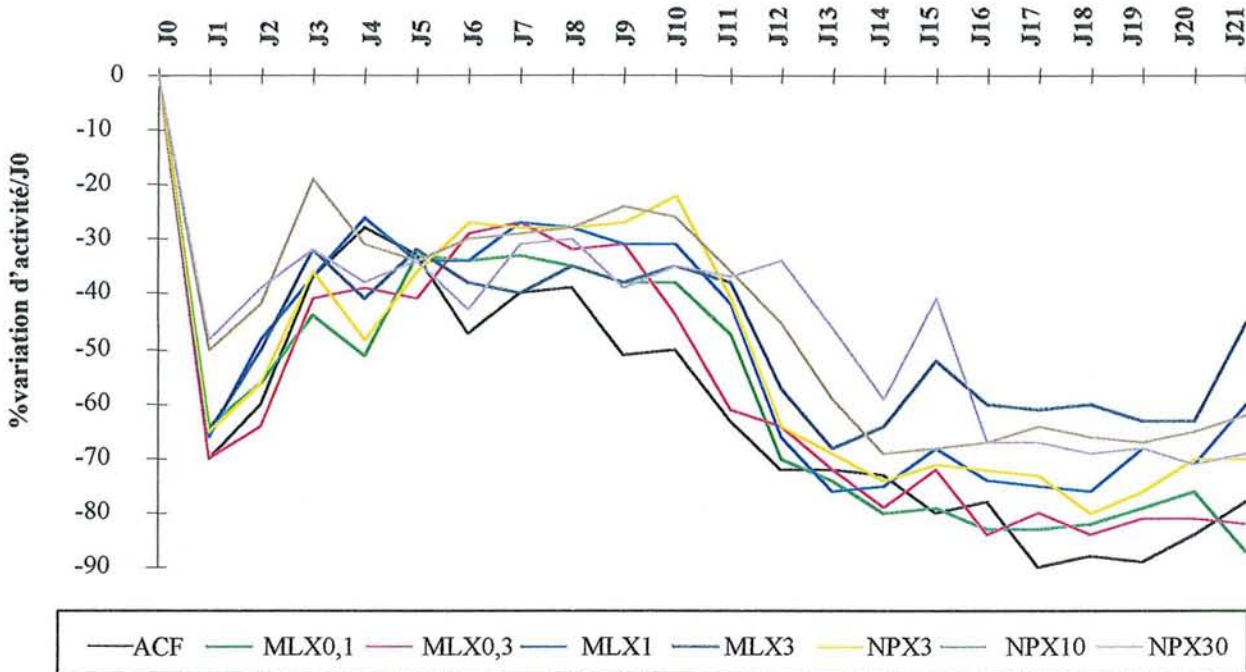


Figure 31 Activité nocturne au cours de la polyarthrite par adjuvant exprimée en pourcentage par rapport à J0 (nuit de référence) (n = 5 animaux par lot)

Ces résultats montrent donc que les AINS n'ont pas d'effet significatif au cours de la phase d'inflammation aiguë (jusqu'à J7), puisqu'ils ne parviennent pas à rétablir, au moins partiellement, l'hypomobilité. Par contre, ils semblent plus efficaces au cours de la phase d'inflammation chronique (J5-J21).

1.4. Réduction des marqueurs biologiques de la réaction inflammatoire

Nous avons choisi d'étudier les variations des concentrations circulantes d'IL-6, comme marqueur biologique de l'inflammation, car il existe une corrélation entre ces concentrations et la sévérité du processus polyarthritique (Leisten et coll, 1990).

La production d'IL-6 se décompose en deux pics : un pic précoce correspondant à l'inflammation aiguë associée à la sensibilisation des animaux (phase aiguë) et un pic tardif correspondant à l'apparition de la polyarthrite (phase chronique). Ceci est illustré par des taux d'IL-6 (Figure 32) qui sont maximum à J2 et à J12 chez les animaux arthritiques.

Le méloxicam et le naproxène diminuent les taux d'IL-6 mais avec des profils différents semblant refléter leur efficacité anti-inflammatoire. Ainsi, le naproxène diminue les taux d'IL-6 pendant la phase précoce et la phase tardive de l'arthrite alors que le méloxicam n'est efficace que pendant la polyarthrite débutante ou déclarée (efficacité maximale du MLX3 à J12).

Il semble donc exister une assez bonne corrélation entre l'efficacité des AINS et leur pouvoir anti-inflammatoire systémique.

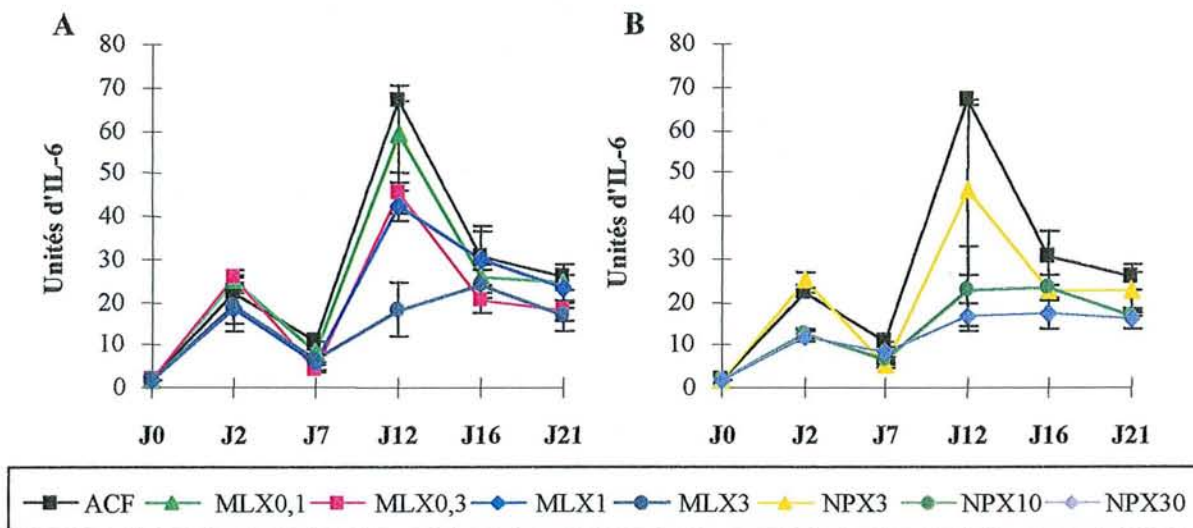


Figure 32 Inhibition de l'IL-6 par le méloxicam (A) et le naproxène (B) au cours de la polyarthrite par adjuvant (n=3 animaux par lot)

II. Propriétés anti-pyrétiques des molécules

Nous avons évalué les propriétés anti-pyrétiques des molécules en mesurant les variations de température corporelle nocturne des animaux par biotélémétrie au cours de la polyarthrite à l'adjuvant.

Les animaux sensibilisés présentent deux pics de fièvre distincts (Figure 33). Le premier pic fugace observé à J1 correspond à la réaction inflammatoire aiguë provoquée par l'injection d'ACF. Le second pic débute vers J7, est maximal à J12 et se prolonge jusqu'à J21. Ce pic correspond au développement de la polyarthrite (phase « chronique ») et est maximal lorsque la polyarthrite s'étend à l'ensemble des articulations.

L'effet antipyrétique des traitements a été étudié en considérant séparément les deux pics de température puisqu'ils correspondent probablement à des phénomènes pathologiques différents. Les résultats exprimés sous la forme des aires sous la courbe entre J1 et J4 d'une part et entre J5 et J21 (Figure 33) d'autre part, montrent que les AINS ont des potentialités différentes.

Ainsi les DI_{50} (doses réduisant l'AUC de 50%) déterminées pour le méloxicam sont respectivement de 0,73 et 0,14 mg/kg/j pour le pic initial et pour le second pic. Le naproxène présente des DI_{50} de 9,44 et de 9,38 mg/kg/j.

Aux pics, les deux AINS ont des $DI_{1,0^{\circ}C}$ (doses abaissant la fièvre de 1°C) différentes. A J1, la $DI_{1,0^{\circ}C}$ du méloxicam est supérieure aux doses testées alors que celle du naproxène est de 5,04 mg/kg/j. A J13, la $DI_{1,0^{\circ}C}$ du méloxicam est de 0,35 mg/kg/j et celle du naproxène est de 4,47 mg/kg/j. Le méloxicam semble donc plus efficace sur le second pic de fièvre que sur le premier, à la différence du naproxène.

Les différences de valeurs de DI_{50} ou de $DI_{1,0^{\circ}C}$, comme celles observées avec la mobilité spontanée des animaux, relèvent probablement des différences pharmacocinétiques entre les deux AINS (demi-vie longue pour le méloxicam et demi-vie courte pour le naproxène).

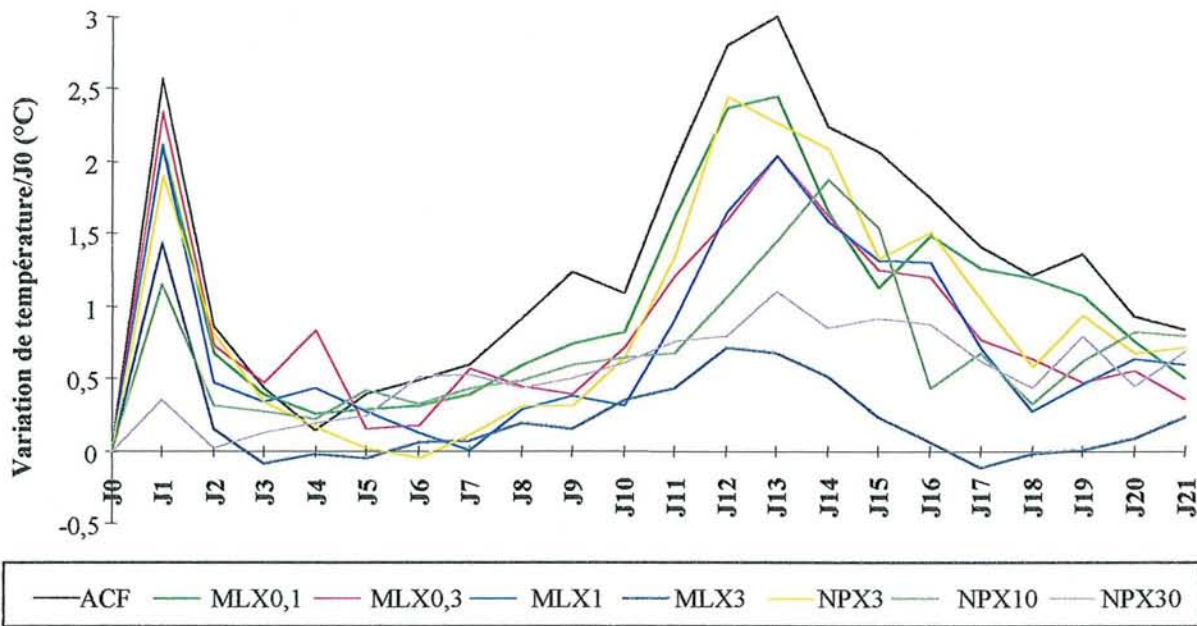


Figure 33 Courbes de température exprimée en variation par rapport à la température de référence prise à J0, au cours de l'arthrite par adjuvant – Etude de l'effet du méloxicam et du naproxène sur la température corporelle nocturne (n = 5 animaux par lot)

III. Répercussion des processus dysimmunitaires sur les organes

lymphoïdes

Chez le rat arthritique, on observe une involution thymique (Figure 34A) et une splénomégalie (Figure 34B) qui apparaissent dès le développement de la polyarthrite (J12). Même s'il n'est pas établi de façon précise si les modifications morphologiques des organes lymphoïdes relèvent directement des désordres immunologiques (transfert passif de la maladie par des cellules spléniques ou certains clones lymphocytaires CD4⁺, vaccination par certains clones lymphocytaires CD8⁻) ou de leurs conséquences sur la réaction inflammatoire systémique, les AINS ont des effets différents sur la rate et le thymus. Ainsi, aucune des concentrations testées ne diminue significativement le poids splénique, même si une réduction importante de ce paramètre pourrait refléter également une éventuelle toxicité du médicament. En revanche, les deux AINS corrigent l'involution thymique, notamment aux fortes concentrations, cet effet étant plus marqué à J12 et J16 qu'à J21. Ces deux paramètres confirment indirectement l'efficacité thérapeutique des AINS (thymus) et leur absence de toxicité aux concentrations étudiées (rate).

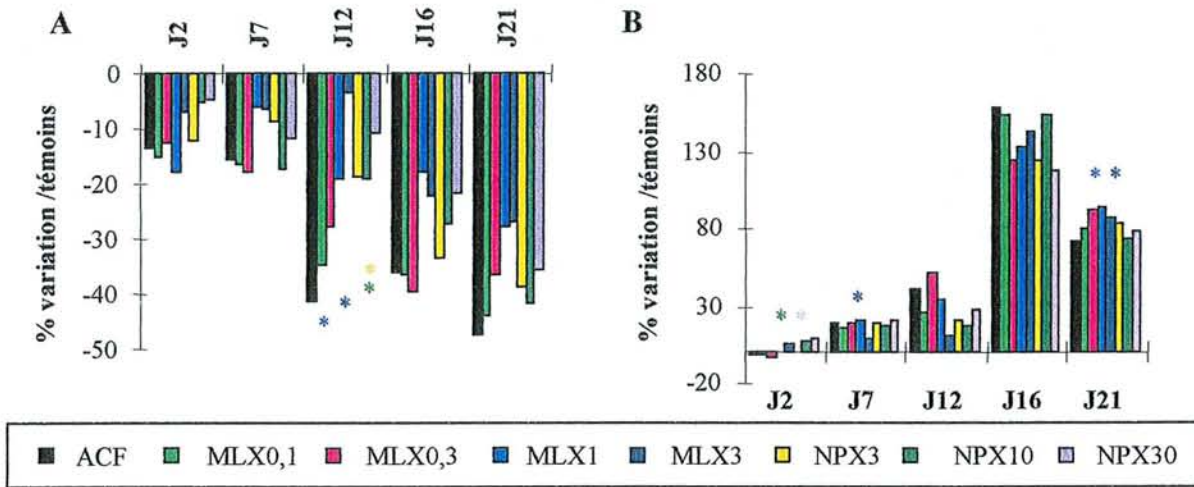


Figure 34 Influence des traitements sur les processus dysimmunitaires - Evolution du poids du thymus (A) et de la rate (B) au cours de l'arthrite par adjuvant (n = 6 animaux par lot) (* : p<0,05 /témoins ACF)

IV. Comparaison de la sélectivité d'inhibition des molécules *in vivo*

IV.1. Production sérique de TxB_2 par les plaquettes

Les taux sériques de TxB_2 fluctuent au cours de la polyarthrite avec un pic précoce à J2 et un second pic important à J12 (Figure 35A et B).

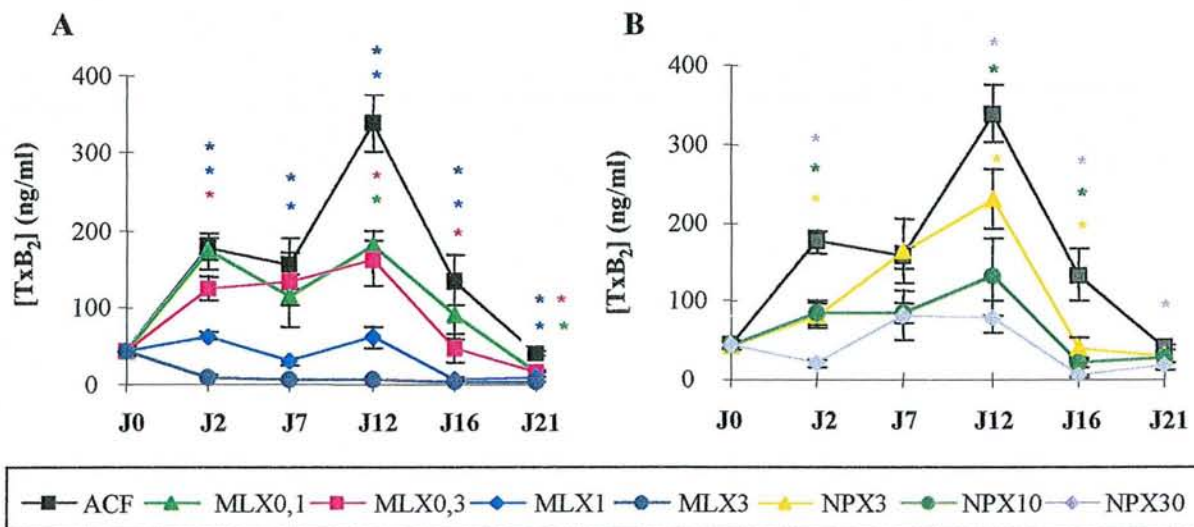


Figure 35 Variation des taux sériques de TxB_2 au cours de la polyarthrite sous l'effet de différentes concentrations de méloxicam (A) et de naproxène (B) (n = 3 animaux par lot) (* : p<0,05 /témoins ACF)

Pour considérer l'effet inhibiteur global des molécules sur cette fonction majoritairement dépendante de COX-1, nous avons pris en compte les AUC de J0 à J21.

Les DI_{50} sont respectivement de 0,30 mg/kg/j pour le méloxicam et de 7,29 mg/kg/j pour le naproxène. L'effet est dose-dépendant pour les deux AINS, mais avec une cinétique un peu différente puisque le naproxène a un effet inhibiteur important dans la phase précoce (J2)

alors que le méloxicam semble plus actif à la phase d'état de la maladie (J12). Comme pour l'effet antipyrétique, ceci est en faveur de l'influence des caractéristiques pharmacocinétiques des deux produits.

IV.2. Production plasmatique de PGE₂ par les leucocytes activés

L'activité de COX-2 a été évaluée avec ou sans stimulation par le LPS, dans le but de vérifier si le développement de la maladie s'accompagne ou non d'une induction de COX-2 dans les leucocytes circulants. Les résultats préliminaires ne montrent pas d'induction de l'activité COX-2 par le LPS (Tableau 15), ce qui ne permet pas d'évaluer correctement le pouvoir inhibiteur des AINS.

Tableau 15 Taux plasmatiques de PGE₂ à J2 après stimulation ou non par du LPS

Traitement	Dose (mg/kg/j)	PGE ₂ (ng/ml)	
		sans LPS	avec LPS
Témoins absolus		6,29 ± 3,92	3,47 ± 1,27
Témoins ACF		2,15 ± 0,44	2,44 ± 0,63
Méloxicam	0,1	1,79 ± 0,14	3,45 ± 1,22
	0,3	2,44 ± 1,27	2,07 ± 0,88
	1	1,75 ± 0,68	2,49 ± 0,53
	3	4,09 ± 0,79	2,67 ± 0,48
Naproxène	3	1,70 ± 0,35	1,11 ± 0,06
	10	1,69 ± ,25	1,88 ± 0,71
	30	2,13 ± 0,40	1,67 ± 0,11

Cependant, nous n'avons pas observé de variations significatives des taux de PGE₂ chez les rats arthritiques au cours de la polyarthrite (Tableau 16).

Tableau 16 Taux plasmatiques de PGE₂ chez des rats arthritiques au cours du développement de la maladie

Témoins ACF	J0	J2	J7	J12	J16	J21
sans LPS	6,29 ± 3,92	2,15 ± 0,44	2,13 ± 0,15	1,58 ± 0,13	1,72 ± 0,11	3,83 ± 1,19
avec LPS	3,47 ± 1,27	2,44 ± 0,63	2,30 ± 0,52	2,51 ± 0,41	1,77 ± 0,28	3,39 ± 0,21

Ceci n'est pas en faveur d'une induction spontanée de la COX-2 leucocytaire au cours d'une inflammation systémique. En revanche, l'absence d'induction par le LPS est surprenante, puisque ce mode de stimulation est très efficace sur le sang total humain et que les faibles concentrations d'aspirine utilisées (10 µg/ml) comme prétraitement, n'inhibent efficacement que la COX-1 plaquettaire.

IV. 3. Pouvoir inhibiteur des AINS dans les tissus cibles

IV.3.1. Inhibition de la synthèse des PGE₂ dans les pattes inflammatoires

Tableau 17 Contenu en PGE₂ dans les pattes inflammatoires (n=4 animaux par lot)

		[PGE ₂] en ng/g de tissu							
		TACF	MLX0,1	MLX0,3	MLX1	MLX3	NPX3	NPX10	NPX30
J2	I	15.6±9.1	15.5±8.3	14.0±7.3	13.8±4.5	10.2±3.9	22.2±7.7	15.6±5.5	11.6±4.0
	NI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
J12	I	29.1±7.6	27.0±6.4	26.8±6.2	15.9±13.6	21.8±3.7	32.1±2.2	21.5±8.0	25.9±6.7
	NI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
J16	I	30.8±11.3	31.5±6.4	10.4±2.7	18.6±2.2	13.1±6.7	23.4±5.4	16.5±10.5	10.0±5.8
	NI	6.0±1.7	3.9±0.8	7.3±1.3	2.7±2.6	0.3±0.1	6.9±6.3	3.6±0.7	4.1±2.5
J21	I	28.2±10.1	26.5±1.5	15.9±6.0	18.2±9.9	5.6±7.1	31.2±3.6	33.7±3.6	26.2±10.8
	NI	16.4±11.3	12.1±10.3	6.7±4.8	3.7±4.5	1.4±1.0	14.4±20.8	11.7±16.2	11.3±10.2

(I=patte injectée ; NI =patte non-injectée ; ND=non déterminée ; Témoins absolus 2,54±0,27 ng/g de tissu)

Les deux AINS sont peu efficaces sur la synthèse de PGE₂ dans la patte injectée au cours de la phase aiguë (J2) puis débutante (J12) de la polyarthrite (Tableau 17). Il existe une relative dose-dépendance de cette inhibition pour le méloxicam et, à un degré moindre pour le naproxène. Le seuil de significativité n'est toutefois pas atteint en raison de la grande variabilité interindividuelle des résultats.

Lors de l'arthrite déclarée, les 2 AINS conservent une faible efficacité sur le contenu en PGE₂ de la patte injectée alors qu'ils exercent un effet inhibiteur marqué dans la patte non-injectée. Le méloxicam est très efficace sur ce paramètre dès la posologie de 1 mg/kg, alors qu'il existe une apparente perte d'efficacité des fortes posologies de naproxène (≥10 mg/kg) entre J16 et J21.

IV.3.2. Inhibition de la synthèse des PGE₂ dans la muqueuse gastrique

Le contenu en PGE₂ des muqueuses gastriques varie peu au cours du développement de la polyarthrite mais demeure toujours inférieur à ce qui est mesuré chez les animaux sains (Figure 36A et B).

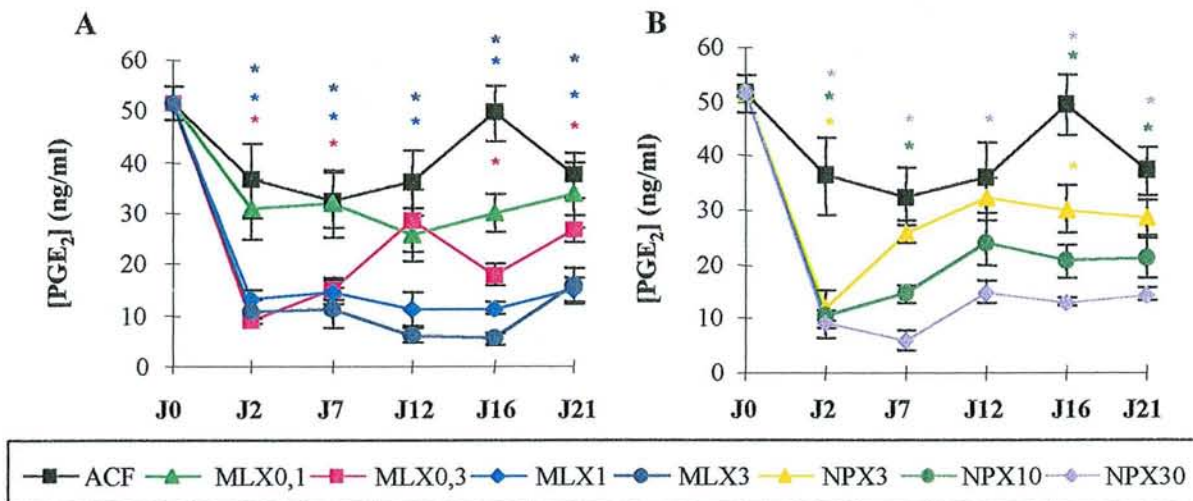


Figure 36 Inhibition des PGE₂ au niveau de la muqueuse gastrique par le méloxicam (A) et le naproxène (B) au cours de la polyarthrite par adjuvant (n = 3 animaux par lot) (* : p<0,05 /témoins ACF)

Les deux AINS inhibent ce paramètre de façon dose-dépendante avec des DI₅₀ calculées sur l'AUC J0-J21 (pouvoir inhibiteur global) de 0,78 mg/kg/j pour le méloxicam et 14,94 mg/kg/j pour le naproxène.

Lorsque ce paramètre est évalué au moment où la sévérité de la polyarthrite est maximale (J21), les DI₅₀ sont respectivement de 1,22 mg/kg/j pour le méloxicam et de 16,33 mg/kg/j pour le naproxène.

La Figure 36 montre également que, pour une posologie donnée de naproxène, l'inhibition est maximale à J2 puis tend à diminuer ce qui suggère l'existence d'une cytoprotection adaptative. Ce phénomène n'est pas retrouvé aussi nettement pour le méloxicam, peut-être en raison de ses caractéristiques pharmacocinétiques (faible inhibition à J2) mais également de son administration quotidienne unique (fractionnement des doses favorable à l'adaptation).

IV.3.3. Index de sélectivité

L'effet du méloxicam sur les paramètres inflammatoires augmente avec le temps comme l'indique la diminution progressive de la DI₅₀ dans les pattes inflammatoires entre J2 et J21 (Tableau 18). Sur ce paramètre, le naproxène n'exerce qu'une efficacité transitoire à J16.

Les DI₅₀ des deux AINS sur les PGE₂ gastriques augmentent nettement entre J2 et J12, ce qui suggère une possible cytoprotection adaptative. Ce phénomène est beaucoup plus marqué pour le naproxène et pourrait être favorisé par l'administration biquotidienne du produit (voir page 102).

Les index calculés à partir des DI₅₀ tissulaires (PGE₂ pattes / PGE₂ gastriques) (Tableau 18) permettent de comparer l'efficacité des molécules à leur tolérance et d'estimer leur index thérapeutique, aux spécificités d'espèces près. Nos résultats montrent un index plus favorable sur la patte non-injectée que sur la patte injectée. Seul le méloxicam obtient un index inférieur

à 1 à J21. Cet index favorable semble cependant être d'avantage due à l'augmentation de l'efficacité du méloxicam avec le temps qu'à l'augmentation de sa tolérance.

Tableau 18 Valeurs des DI₅₀ du méloxicam (MLX) et du naproxène (NPX) sur les contenus en PGE₂ dans les pattes inflammatoires et la muqueuse gastrique. Calcul des index de tolérance (DI₅₀ PGE₂ pattes/DI₅₀ PGE₂ gastrique).

		DI ₅₀ PGE ₂ pattes (mg/kg/j)		DI ₅₀ PGE ₂ gastriques (mg/kg/j)		DI ₅₀ PGE ₂ pattes/ DI ₅₀ PGE ₂ gastriques	
		MLX	NPX	MLX	NPX	MLX	NPX
J2	I	>3	>30	0,33	<3	a	a
	NI	ND	ND			ND	ND
J12	I	>3	>30	0,52	20,03	a	a
	NI	ND	ND			ND	ND
J16	I	1,16	11,9	0,41	14,74	2,83	0,80
	NI	0,81	>30			1,97	a
J21	I	0,87	>30	1,22	16,33	0,71	a
	NI	0,26	>30			0,21	a

(a: non calculable ; ND: non déterminé)

V. Effet des molécules sur l'anabolisme du cartilage patellaire

Cette étude a été faite sur les rotules du coté injecté et du coté non-injecté. Nous avons dissocié la partie centrale de la rotule de sa partie périphérique puisque ces deux régions anatomiques peuvent être affectées différemment au cours de certains modèles d'arthropathie (arthrose notamment). Nous n'avons observé aucune différence dans les profils d'incorporation de sulfate radiomarqué entre le centre et la périphérie des rotules, ce qui nous a amené à ne présenter que les résultats obtenus pour la partie centrale (Figure 37A et B).

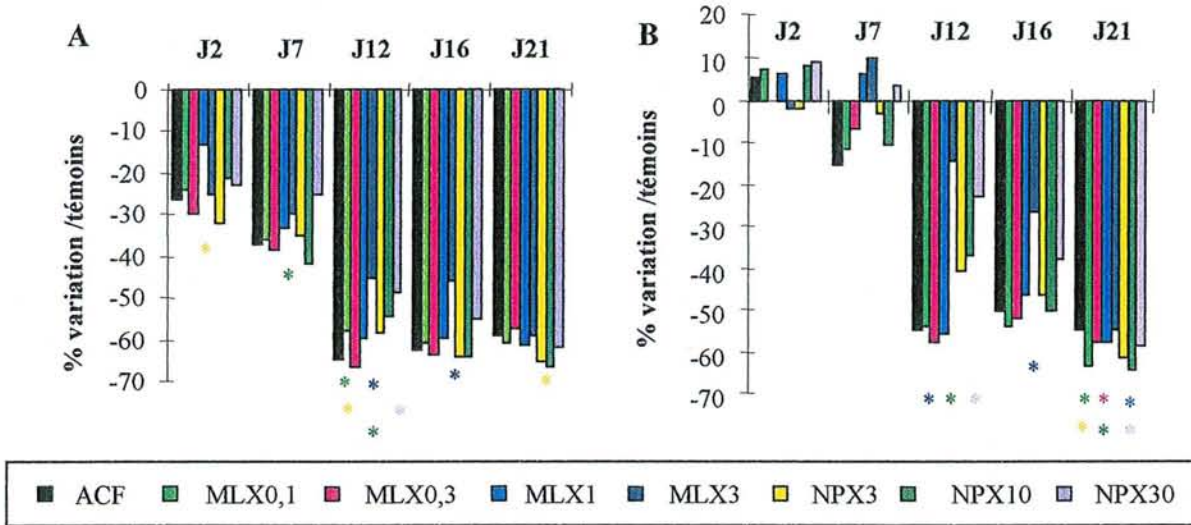


Figure 37 Anabolisme du cartilage patellaire du côté injecté (A) et non-injecté (B) au cours de l'arthrite à l'adjuvant et influence de différentes doses de méloxicam et de naproxène (n = 6 animaux par lot) (* : $p < 0,05$ /témoins ACF)

Du côté injecté une baisse d'anabolisme du cartilage est observée dès J2 et elle est maximale à partir de J12. Aux faibles concentrations, le naproxène aggrave l'inhibition d'anabolisme à J7 et J21 alors qu'il exerce un effet favorable à la plus forte concentration à J7 et J12. La variabilité des effets observés et leur apparente discordance entre les concentrations relèvent probablement davantage des conditions expérimentales que d'un effet propre du médicament. En revanche, le méloxicam n'exerce aucun effet aggravant sur ce paramètre.

Du côté non-injecté, la baisse d'anabolisme apparaît vers J7 et est maximale dès J12 (phase clinique de la polyarthrite). Les fortes posologies d'AINS (méloxicam 3 mg/kg/j et naproxène 30 mg/kg/j) corrigent partiellement la baisse d'anabolisme à J7, J12 et J16, mais elles sont sans effet à J21. Aucun effet aggravant n'est cependant observé sur ce paramètre.

VI. Tableau récapitulatif

Au cours de ce protocole, le méloxicam et le naproxène ont exercé les effets suivants sur nos paramètres d'évaluation :

Produit	Méloxicam	Naproxène	
Score 3 pattes			
• DE ₂₅ à J21 en mg/kg/j	0,47	15,8	
• DE ₄₀ à J21 en mg/kg/j	1,57	>30	
Œdème patte non injectée			
• DE ₅₀ à J21 en mg/kg/j	0,24	7,34	
Fièvre par biotélémetrie			
• DI _{1,0°C} en mg/kg/j	Pic initial (J1)	>3	5,04
	Pic secondaire (J13)	0,35	4,47
• DI ₅₀ AUC en mg/kg/j	Pic initial (J0-J4)	0,73	9,44
	Pic secondaire (J5-J21)	0,14	9,38
Hypomobilité par biotélémetrie			
• DI ₂₀ AUC en mg/kg/j	Phase aiguë (J0-J4)	>3	21,56
	Phase secondaire (J5-J21)	1,68	4,66
Anabolisme patellaire des protéoglycanes			
	J2-J21	Pas effet significatif	Pas effet significatif
Production plaquettaire de TxB₂			
• DI ₅₀ AUC J0-J21 en mg/kg/j	0,30	7,29	
Contenu en PGE₂ muqueuse gastrique			
• DI ₅₀ AUC J0-J21 en mg/kg/j	0,78	14,94	
• DI ₅₀ à J21 en mg/kg/j	1,22	16,33	
Contenu en PGE₂ des pattes inflammatoires			
• DI ₅₀ à J21 en mg/kg/j	Patte injectée	0,87	>30
	Patte non injectée	0,26	>30
Index de tolérance à J21 (PGE₂ patte/PGE₂ muqueuse)			
	Patte injectée	0,71	Non calculable
	Patte non injectée	0,21	Non calculable
Taux circulants d'IL-6			
• DI ₅₀ à J12 en mg/kg/j	1,08	5,80	

Biotelemetric assessment of meloxicam's efficacy in adjuvant arthritis with special care to tissular cyclooxygenase inhibition and cartilage anabolism

Boileau Christelle¹, Blain Hubert¹, Nédélec Emmanuelle¹, Lleu Pierre-Louis^{2†}, Koufany Meriem¹,
Terlain Bernard¹, Gillet Pierre¹, Netter Patrick¹, Pairet Michel^{2‡}, Jouzeau Jean-Yves¹

¹Laboratoire de Pharmacologie et UMR 7561 CNRS-UHP,
Faculté de Médecine de Nancy,
54505 Vandoeuvre-lès-Nancy,
France

²Boehringer-Ingelheim,

[†]51060 Reims, France

[‡]88397 Biberach an der Riss, Germany

Corresponding author : Patrick Netter, MD, PhD, Laboratoire de Pharmacologie et UMR 7561
CNRS-UHP, Faculté de Médecine de Nancy, avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505
Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Tel : (00 33) 3-83-59-26-22 ; Fax : (00 33) 3-83-59-26-21 ; E-
mail : netter@facmed.u-nancy.fr

Keywords: meloxicam, adjuvant arthritis, cyclooxygenases, selectivity index, proteoglycan

Running title: Pharmacology of meloxicam in arthritic conditions

This work was supported by a grant from Boehringer-Ingelheim Pharma

Etude expérimentale
2^{ème} partie

***Effet d'un inhibiteur sélectif de COX-2,
Célécoxib, sur le cartilage articulaire
dans différents modèles d'arthrite***

I. Effet du célécoxib sur la fonction articulaire et le cartilage patellaire dans le modèle expérimentale d'arthrite aiguë au zymosan chez le rat

I.1. MATERIEL ET METHODE

I.1.1. Animaux et traitement

I.1.1.a. Animalerie

Les rats Wistar mâles (Charles River, France) pesant 130 à 150 g sont placés par groupe de 6 et hébergés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (voir page 102).

I.1.1.b. Induction de l'arthrite et traitements

Les traitements sont administrés sous la forme de suspension dans 0,5% de CMC contenant 0,025% de Tween 20, à partir du jour de l'injection (J0).

L'arthrite est induite par l'injection intra-articulaire unilatérale (dans le genou droit) ou bilatérale (pour l'étude biotéléométrique) de zymosan (2 mg dans 50 µl de sérum physiologique stérile).

Le célécoxib est utilisé à 3 posologies : 1, 3 et 10 mg/kg/j en deux administrations quotidiennes et le naproxène à deux posologies : 10 et 30 mg/kg/j en deux administrations quotidiennes. Les témoins reçoivent l'excipient deux fois par jours pour provoquer le même stress chez tous les animaux.

I.1.2. Paramètres étudiés

I.1.2.a. Température corporelle et activité locomotrice

L'enregistrement en continu de la température corporelle et de l'activité locomotrice est faite comme décrite précédemment (voir page 102) par biotéléométrie de J0 à J5 après une injection bilatérale de zymosan, avec une attention particulière pour la fièvre entre J0 et J2.

Les résultats sont exprimés en variation de température et de mobilité nocturnes en référence à la nuit précédent l'injection.

L'effet des deux molécules a été testé après l'administration d'une demi-dose avant l'injection ou après l'administration d'une dose complète avant l'induction.

I.1.2.b. Mesure du diamètre des genoux

La mesure du diamètre des genoux est réalisée à l'aide d'un caliper Oditest avant l'injection (J0), puis à 1, 2 ou 4 jours après une injection intra-articulaire unilatérale de zymosan. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport au genou non-injecté.

1.1.2.c. Anabolisme des protéoglycanes

La mesure de ce paramètre biochimique est faite à J2 et J4 après une injection unilatérale de zymosan. L'étude est faite sur les rotules avec une attention particulière portée à la partie centrale (punch de 2 mm de diamètre réalisé à l'aide d'un emporte-pièce (Biopsy Punch, Stiefel, France) par une incorporation *ex vivo* de soufre radiomarqué. Brièvement, les rotules sont prélevées stérilement sur les animaux après leur sacrifice suivant la procédure décrite précédemment. Elles sont disséquées puis placées dans 1 ml de milieu RPMI Hépés 1640 supplémenté avec 1% de glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine. Elles sont ensuite incubées *ex vivo* à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂ dans un milieu identique contenant 0,8 µCi de Na₂³⁵SO₄ suivant le même protocole que celui décrit plus haut (voir page 104).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport au genou non-injecté.

1.1.2.d. Dosage de l'interleukine-6 circulante

L'IL-6 est mesurée sur le sérum prélevé sur les animaux à J2 et J4 par ponction intracardiaque après leur anesthésie. Le sang est prélevé dans des tubes stériles et le sérum est obtenu par prélèvement du surnageant après centrifugation des tubes à température ambiante à 2000 g (3200 rpm) pendant 10 min (centrifugeuse Juan BR 3.11).

Le principe du dosage repose sur la prolifération IL-6 dépendante de l'hybridome murin 7TD1 et a été décrit précédemment (voir page 106).

1.1.3. Analyse statistique

Les résultats ont été comparés par l'analyse des variances à l'aide du logiciel super ANOVA (Abacus Concept Inc., Berkeley, CA) suivie du test S de Scheffé. Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne ± écart type centré sur la moyenne (m ± sem). Le seuil de significativité a été choisi à 5 %.

I.2. RESULTATS

I.2.1. Effet anti-œdémateux

L'œdème du genou consécutif à l'injection de zymosan est maximale le premier jour qui suit l'induction (Figure 38). Les deux traitements permettent de réduire l'œdème de façon dose-dépendante. Le CXB s'avère capable de réduire l'œdème de façon significative à J2 à la dose de 3 mg/kg/j et à J4 à la dose de 10 mg/kg/j. Le NPX n'est efficace qu'à J4 à la dose de 30 mg/kg/j.

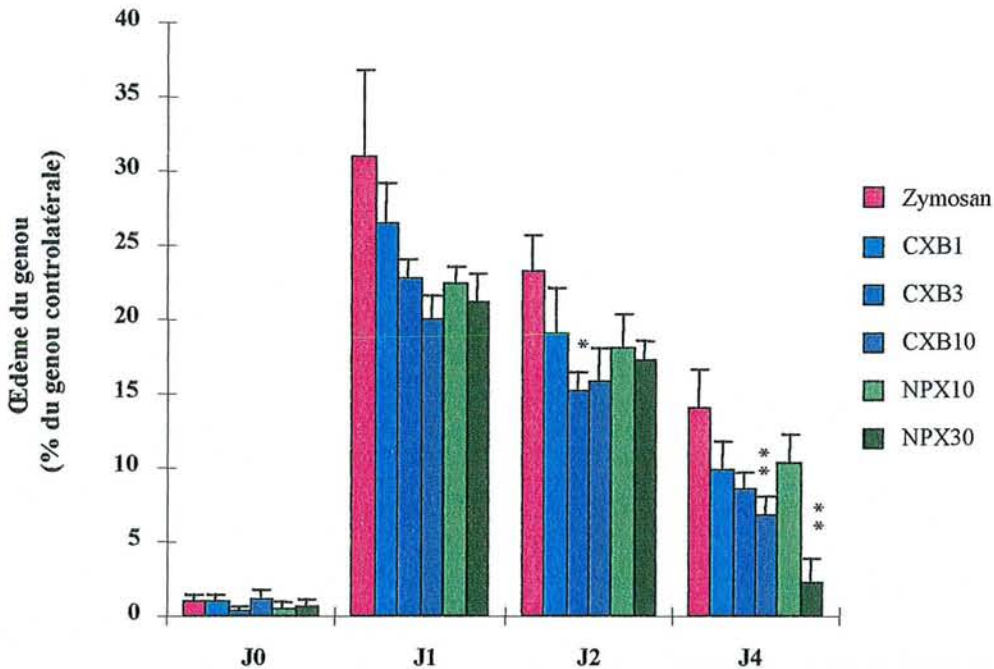


Figure 38 Œdème du genou au cours de l'arthrite au zymosan (injection unilatérale dans le genou droit) exprimé en pourcentage de variation par rapport au genou controlatérale (genou gauche) (n=8 animaux par groupe) (* : p<0,05)

I.2.2. Réduction du handicap fonctionnel

I.2.2.1. Demi-dose avant l'induction de l'arthrite

La perte spontanée de mobilité consécutif à l'injection bilatérale intra-articulaire de zymosan débute la première nuit suivant l'induction (N0), et est d'emblée maximale (Figure 39).

Nous n'avons pu établir de corrélation entre les intensités de la fièvre et de l'hypomobilité chez les animaux arthritiques au cours des deux expériences.

Nous avons observé un effet limité du CXB3 et du NPX 10 au cours de l'expérience 2. Cependant, cette expérience témoigne d'une faible hypomobilité.

Le CXB montre un effet dose-dépendant au niveau du pic d'hypomobilité mais globalement le NPX 10 est plus efficace que le CXB3 sur la perte maximale d'activité locomotrice

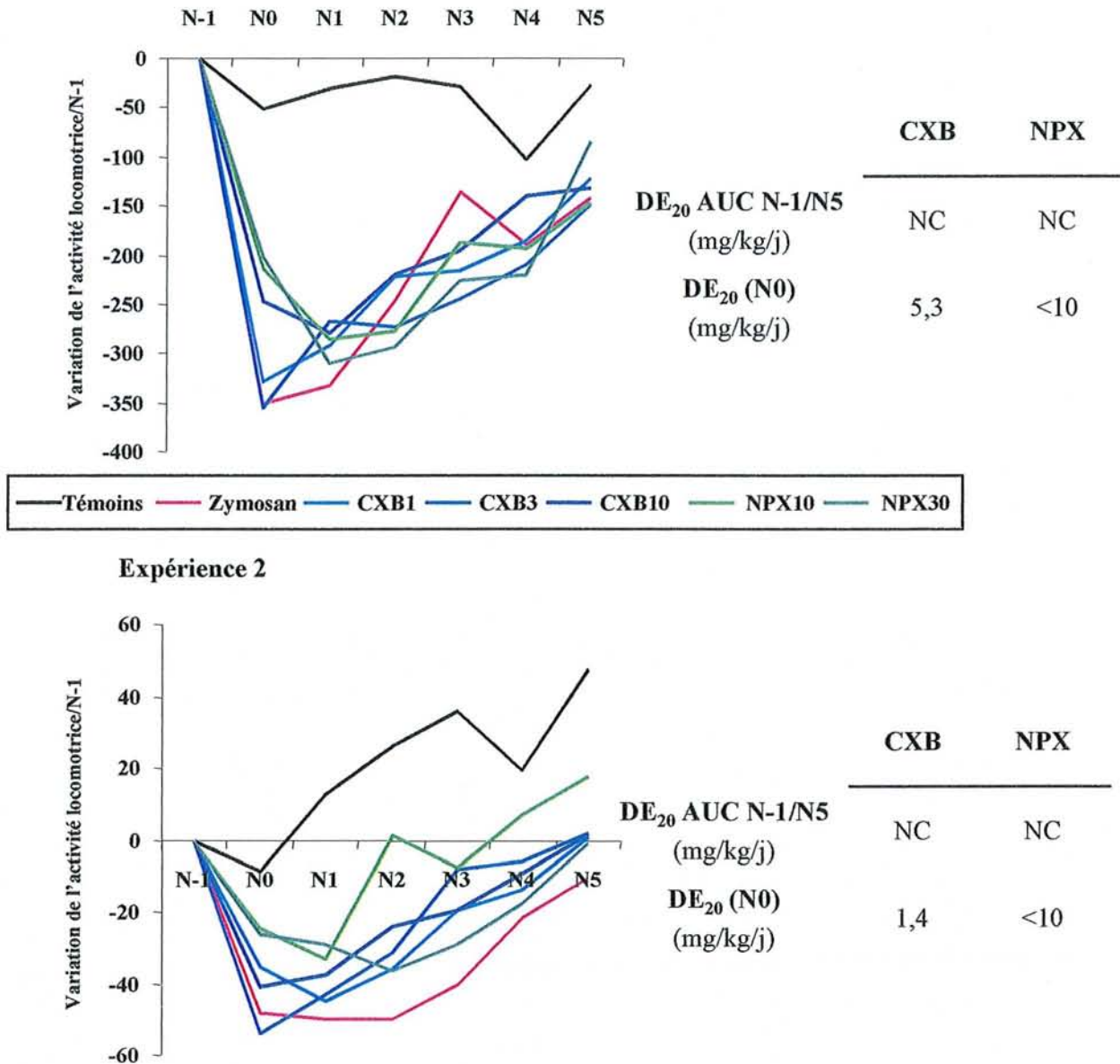


Figure 39 Evolution de l'activité locomotrice nocturne au cours de l'arthrite au zymosan et effet du CXB et du NPX (n=8 animaux par groupe)

1.2.2.2. Pleine dose avant l'induction de l'arthrite

Les deux doses de CXB (CXB3 et 10) et une dose de NPX (NPX30) sont efficaces dans une des deux expériences (expérience 2).

L'administration d'une dose complète de traitement avant l'induction de l'arthrite ne permet pas d'obtenir un meilleur effet correcteur sur l'hypomobilité spontanée (Figure 40).

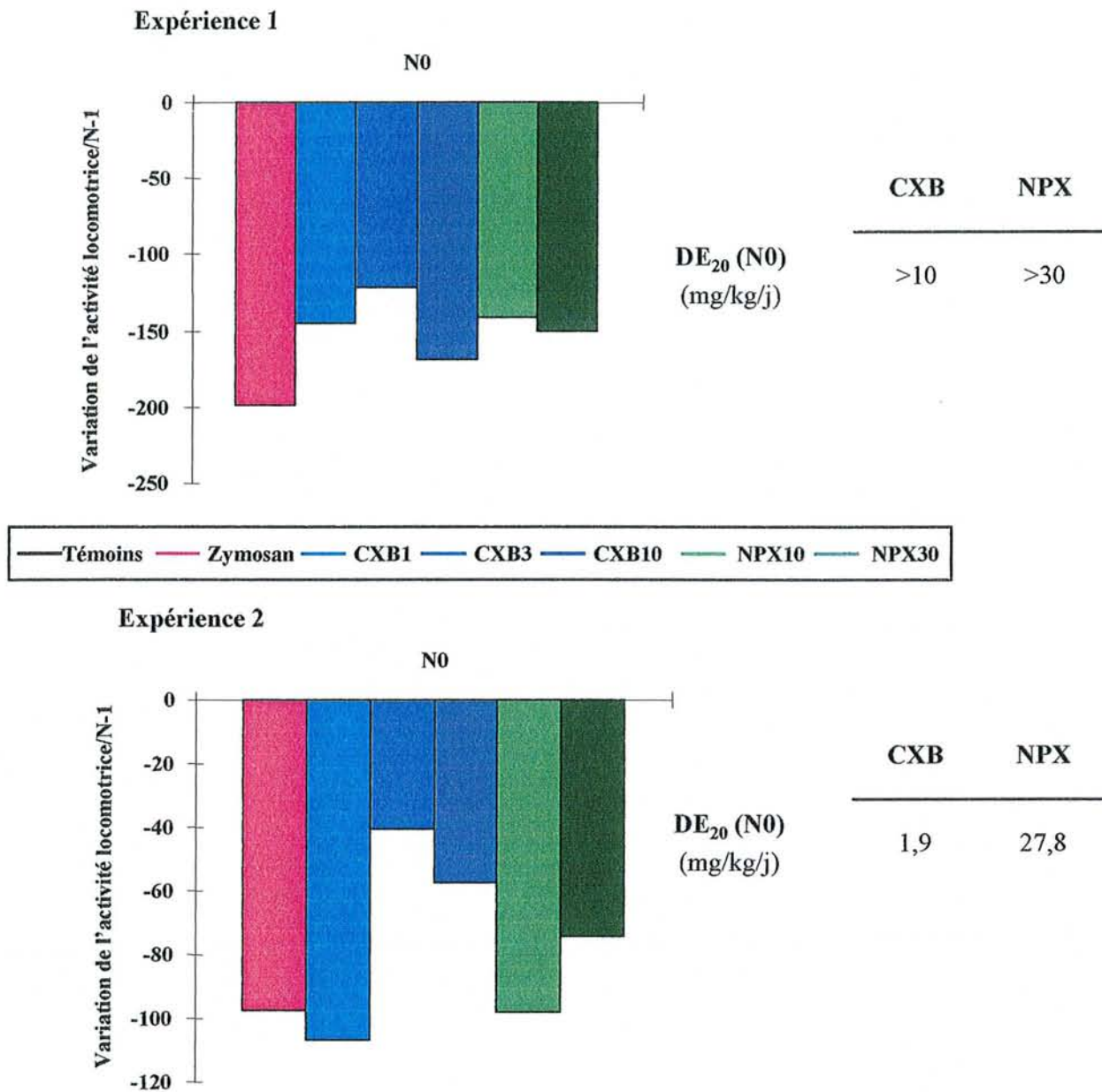


Figure 40 Evolution de l'activité locomotrice spontanée durant la nuit suivant une injection intra-articulaire bilatérale de zymosan et une administration pleine dose de CXB et de NPX (n=5 animaux par groupe)

1.2.3. Taux d'IL-6 circulante

Nous n'avons pu mesurer qu'une faible augmentation des taux d'IL-6 chez les animaux arthritiques (à J2 et à J4). Cette augmentation n'atteint pas le niveau de significativité. Les AINS sont sans effet aux deux temps.

1.2.4. Propriétés anti-pyrétiques des molécules

1.2.4.1. Demi-dose avant l'induction de l'arthrite

L'injection intra-articulaire bilatérale de zymosan conduit à une augmentation significative de la température corporelle au cours de la première nuit suivant l'induction (Figure 41). Elle retourne ensuite à une valeur quasi-normale jusqu'à la fin de l'expérience.

Le pic de fièvre est beaucoup plus marqué dans l'expérience 2. Ceci permet un effet plus marqué des AINS.

Le CXB inhibe la fièvre de façon dose-dépendente. Par contre, il ne nous a pas été possible de reproduire les effets du NPX dans les deux expériences.

Les effets du CXB3 et du NPX10 sont similaires.

Les deux molécules ne montrent pas d'effet différents sur le retour au niveau de base de la température (entre N0 et N1).

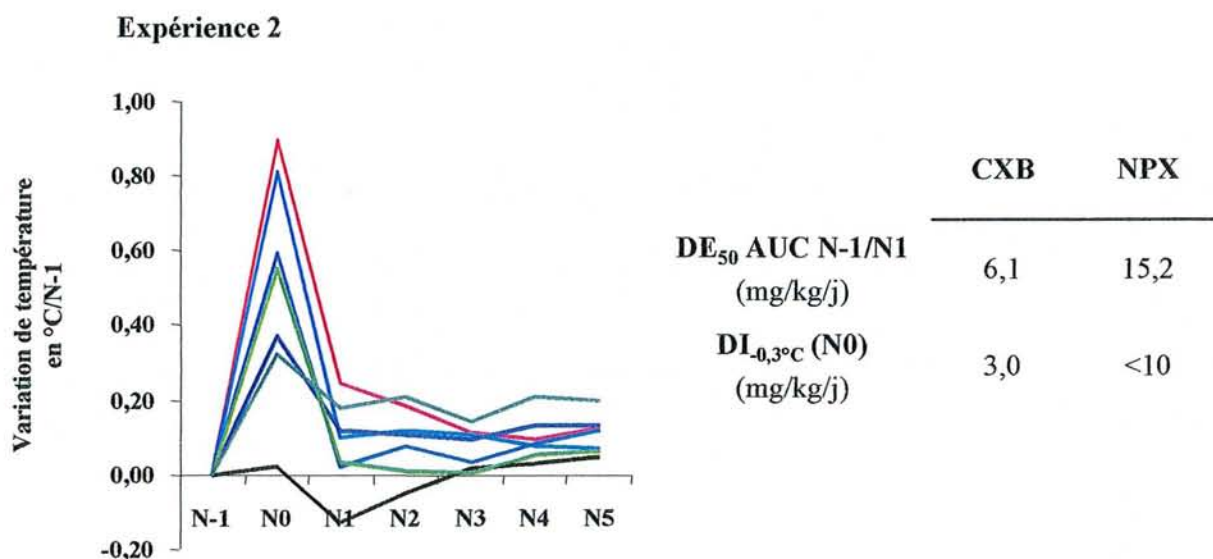
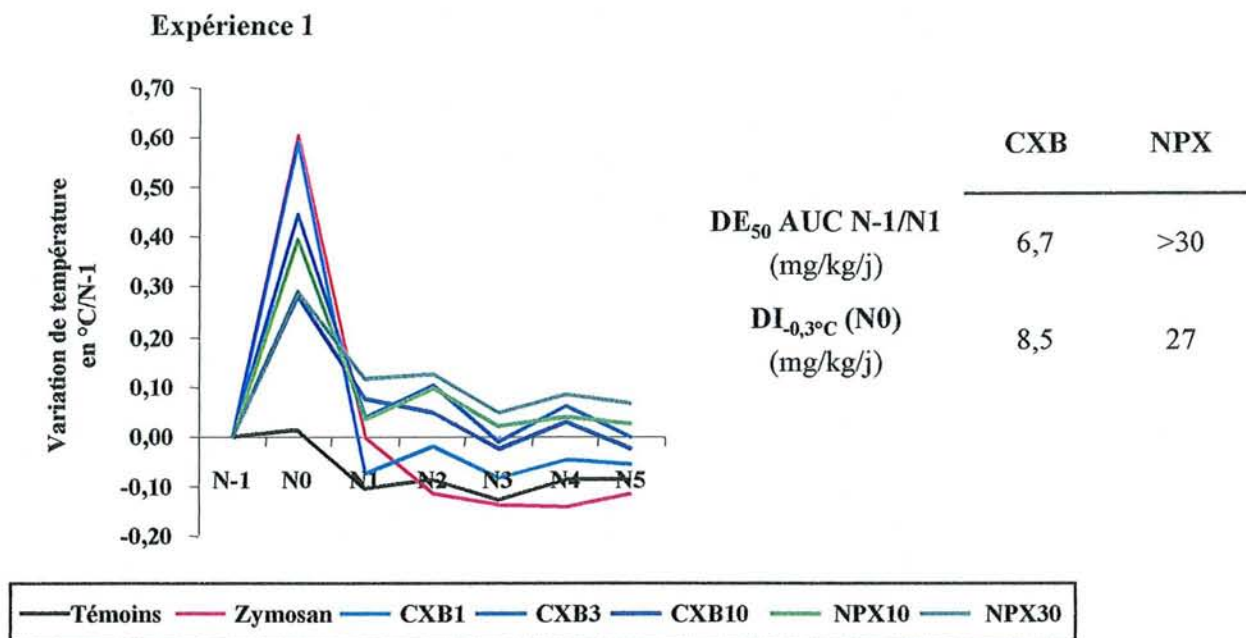


Figure 41 Evolution de la température corporelle nocturne au cours de l'arthrite au zymosan et effet du célécoxib (CXB) et du naproxène (NPX) (n=8 animaux par groupe)

1.2.4.2. Pleine dose avant l'induction

L'administration de CXB pleine dose avant l'injection intra-articulaire de zymosan dans les deux genoux confirme son effet dose-dépendant (Figure 42).

Le NPX est lui aussi capable d'inhiber l'augmentation de la température corporelle nocturne de façon dose-dépendante.

L'efficacité des deux molécules est augmentée en comparaison à l'efficacité observée après une demi-dose avant l'injection. Cette constatation est d'autant plus importante pour le NPX.

Il est possible que le NPX à la plus forte dose (NPX30) ait un effet hypothermique.

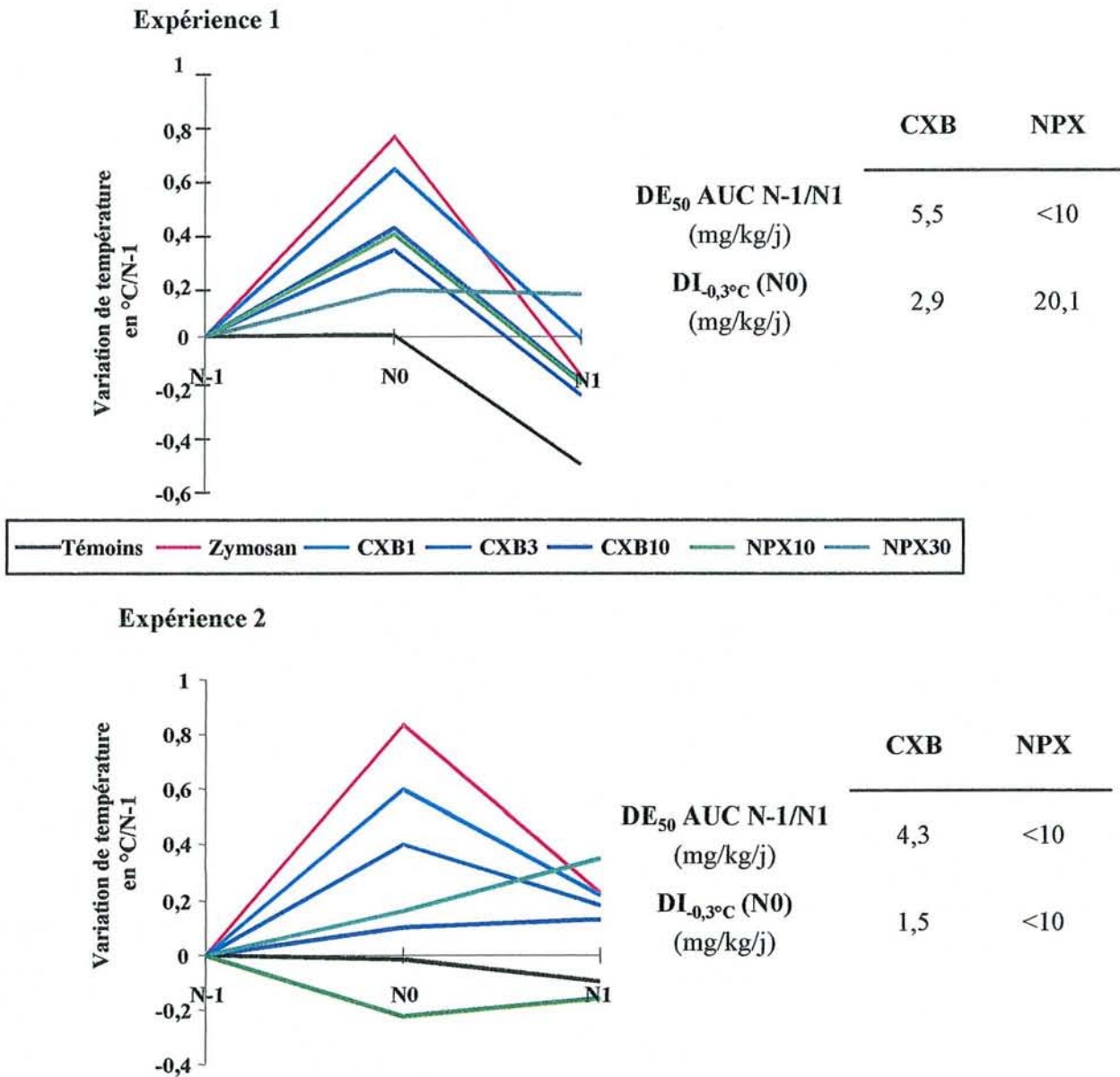


Figure 42 Evolution de la température corporelle après une injection bilatérale de zymosan en intra-articulaire et après l'administration d'une pleine dose de CXB ou de NPX avant l'induction (n=5 animaux par groupe)

1.2.5. Anabolisme des protéoglycanes du cartilage

L'injection de zymosan provoque une baisse significative de l'incorporation de sulfate radiomarqué aussi bien au centre qu'en périphérie de la rotule (Figure 43). Cette baisse reflète la diminution de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage. Les deux traitements sont sans effet sur la baisse d'anabolisme des protéoglycanes du cartilage au centre de la rotule à J2, alors qu'il existe un léger effet inhibiteur du célécoxib à J4. De même, il existe un effet inhibiteur modéré dans la périphérie de la rotule à J2 avec le célécoxib à la dose de 3 mg/kg/j

et avec le naproxène aux deux doses testées. Cependant, aucun effet délétère n'est observé dans cette partie du cartilage à J4.

Ces résultats ne suggèrent donc pas d'effets délétères des deux molécules dans nos conditions expérimentales et aux doses testées.

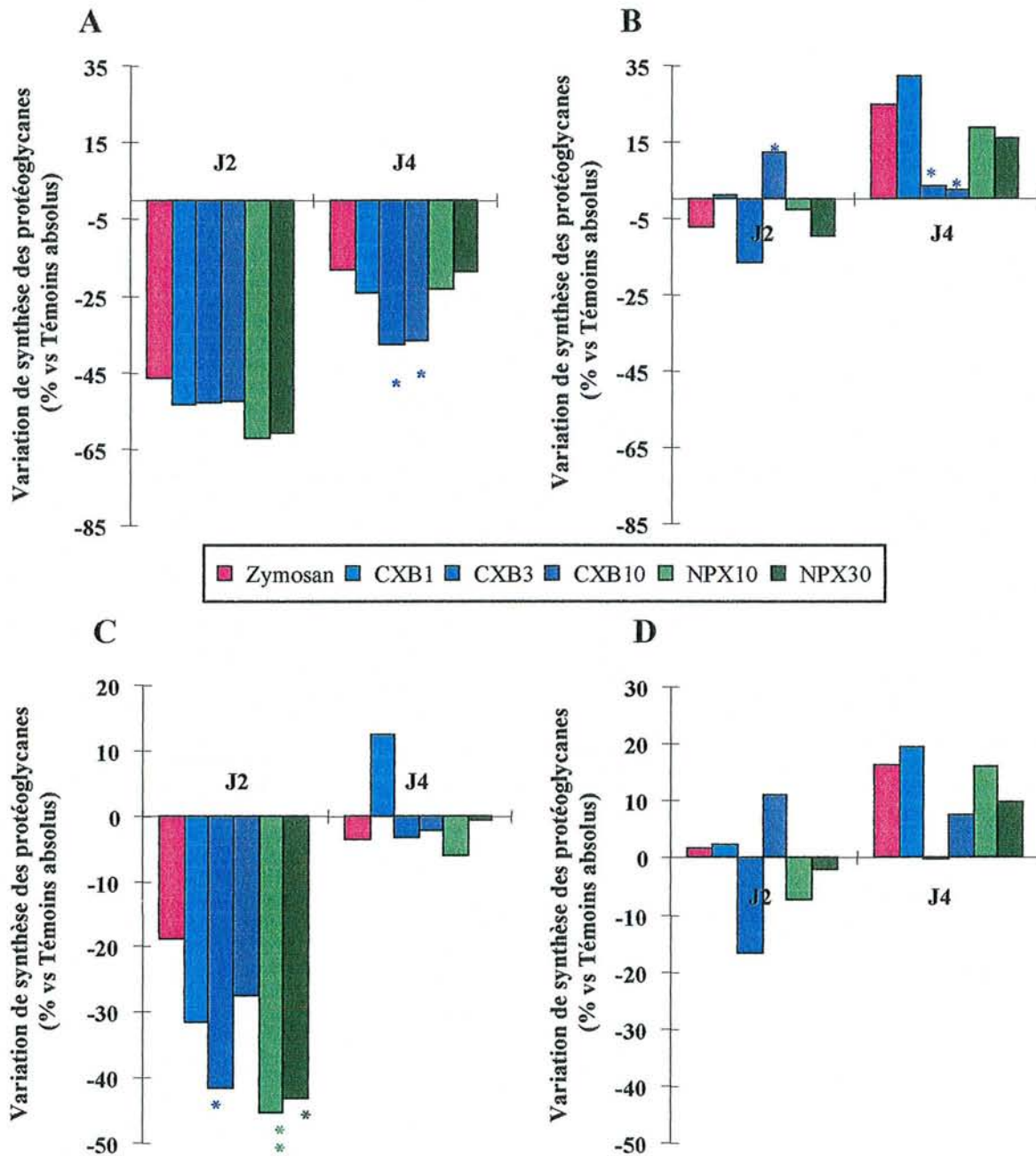


Figure 43 Variation de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage au centre (A et B) et en périphérie (C et D) de la rotule après une injection unilatérale de zymosan (A et C) ou de sérum physiologique (B et D) (n=8 animaux par groupe) (* : p<0,05 ; ** : p<0,001)

I.3. ANALYSE GLOBALE

Nous avons pu constater la bonne efficacité du CXB sur la fièvre consécutive à l'induction d'une arthrite aiguë par une injection bilatérale de zymosan. Le CXB utilisé à la dose de 10 mg/kg/j a une efficacité équivalente à celle du NPX à la dose de 30 mg/kg/j.

Par contre, les deux molécules n'ont qu'un effet faible sur l'hypomobilité. Dans ce cas, le NPX à 10 mg/kg/j a un effet plus marqué que le CXB 3 mg/kg/j.

L'administration d'une dose complète juste avant l'injection de zymosan permet d'améliorer l'efficacité des traitements sur la fièvre mais ne permet en aucun cas de corriger l'hypomobilité induite par le zymosan.

Les deux molécules permettent une réduction considérable de l'œdème du genou.

Nous avons pu mettre en évidence une tendance globale à l'aggravation de la perte d'anabolisme des protéoglycanes au niveau de la rotule du côté injectée et une réduction de l'overshoot du côté controlatérale (injecté avec du sérum physiologique).

De même, nous avons pu noter la bonne tolérance globale des deux traitements, aux doses testées, sur le cartilage.

II. Effet du célécoxib sur la fonction articulaire et le cartilage patellaire dans le modèle expérimental de polyarthrite (arthrite à l'adjuvant) chez le rat

II.1. MATERIEL ET METHODE

II.1.1. Animaux et traitements

II.1.1.1. Animalerie

Les rats Lewis mâles 150-175 g (Charles River, France) étant plus sensibles à l'adjuvant complet de Freund sont utilisés pour cette étude. Ils sont hébergés comme décrit précédemment (voir page 102).

II.1.1.2. Induction de l'arthrite et traitements

Les traitements sont administrés sous la forme de suspension dans 0,5% de CMC contenant 0,025% de Tween 20, à partir du jour de l'injection (J0).

L'arthrite est induite comme décrite précédemment (voir page 102)

Le célécoxib est utilisé à 3 posologies : 0,3, 1 et 3 mg/kg/j en deux administrations quotidiennes et le naproxène à deux posologies : 10 et 30 mg/kg/j en deux administrations quotidiennes. Les témoins reçoivent l'excipient deux fois par jours pour provoquer le même stress chez tous les animaux.

II.1.2. Evaluation de la sévérité de l'arthrite

Le « Matériel et Méthodes » correspondant à cette partie a été décrit précédemment (voir à partir de la page 102)

II.1.2.1. Température corporelle et activité locomotrice

II.1.2.2. Paramètres classiques d'évaluation de la sévérité de l'arthrite

II.1.2.4. Mesure de l'IL-6 circulante

II.1.3. Anabolisme des protéoglycanes

II.1.4. Contenu en médiateurs dans les tissus cibles

II.1.4.1. Contenu en PGE₂ dans les pattes arthritiques

II.1.4.1. Contenu en PGE₂ dans la muqueuse gastrique

II.1.4.3. Taux circulant de TxB₂

II.1.5. Analyse statistique

II.2. RESULTATS

II.2.1. Comparaison des effets anti-inflammatoires des molécules

II.2.1.1. Evolution de la masse pondérale et du score clinique

Les animaux arthritiques subissent une perte de gain de poids importante. Celle-ci est maximale quand la polyarthrite se généralise (à partir de J12) (Figure 44A et B). Les deux AINS, aux doses utilisées, ne montrent aucune toxicité, qui se manifesterait par une perte de poids supplémentaire. Les traitements corrigent la perte de gain de poids de façon dose-dépendante. L'efficacité maximale est observée sur la phase tardive de la maladie.

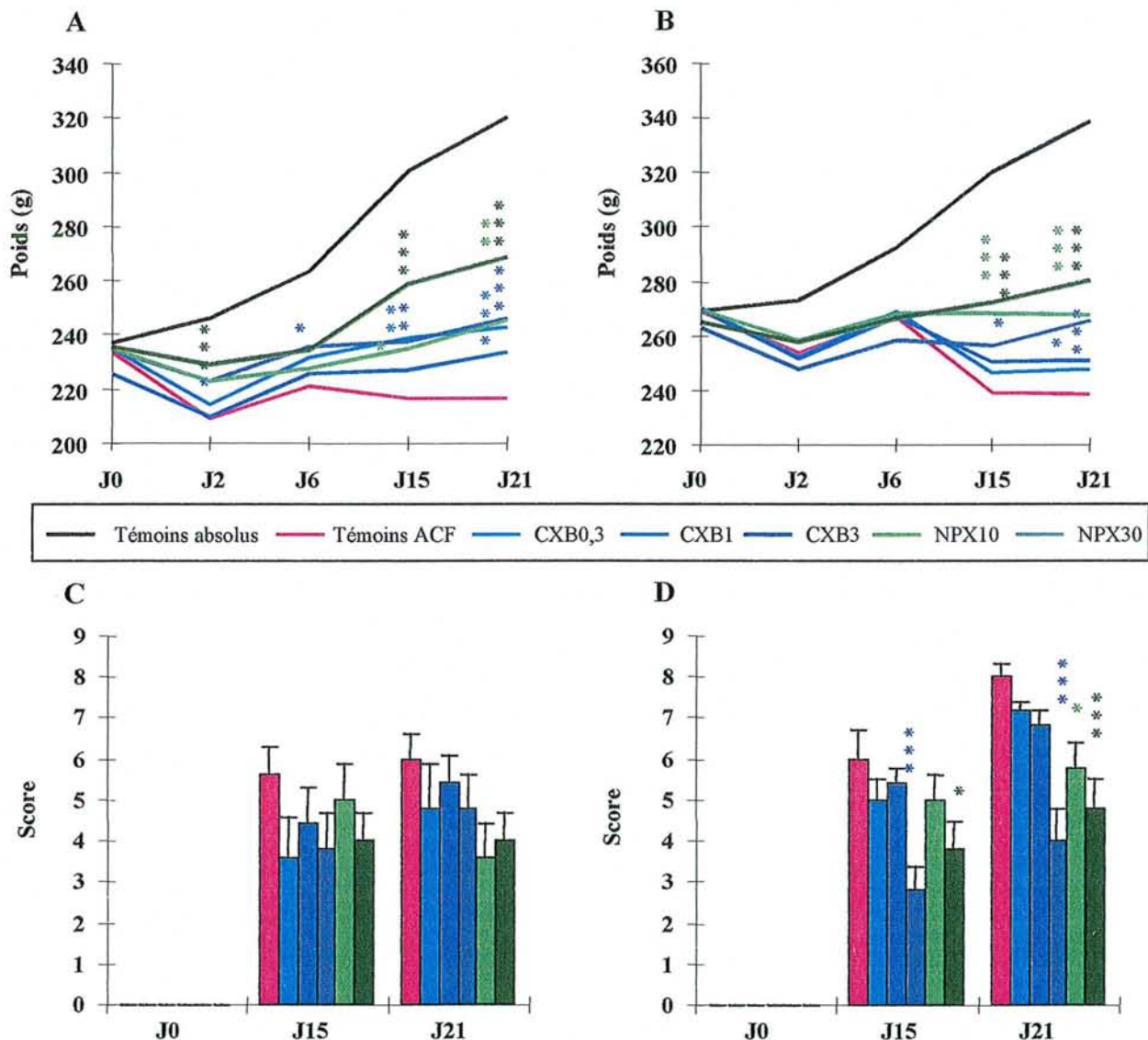


Figure 44 Evolution du poids des animaux au cours de la polyarthrite à l'adjuvant (A et B) et évaluation du score de sévérité d'arthrite sur les 3 pattes non-injectée (C et D) et effet du traitement par différentes doses de CXB et de NPX. Les mesures sont réalisées au cours de deux expériences différentes (expérience 1 : A et C ; expérience 2 : B et D) (n=5 par groupe) (* : p<0,05 ; ** : p<0,001 ; *** : p<0,005).

Le score de sévérité d'arthrite, déterminé sur les 3 pattes non-injectées, nous permet de confirmer la généralisation de la polyarthrite à partir de J12 (Figure 44C et D).

Les AINS sont capables de réduire la sévérité de l'arthrite (Tableau 19). Le CXB à la dose de 3 mg/kg/j a une efficacité comparable à celle du NPX à 30 mg/kg/j. Les deux AINS à ces deux doses ont un effet maximale à J15 et J21 dans une des deux expériences (Figure 44D).

Tableau 19 Quantification de l'efficacité des traitements sur le score de sévérité d'arthrite au cours des deux expériences réalisées (A et B)

	A		B	
	CXB	NPX	CXB	NPX
DE₃₀ J15	>3	>30	1,2	20,8
DE₃₀ J21	2,1	18,7	1,3	12,4

DE₃₀ en mg/kg/j: dose efficace permettant de réduire de 30% le score de sévérité d'arthrite

II.2.1.2. Effet anti-œdémateux

L'œdème des pattes postérieures suit les deux phases décrites par la fièvre en biotélémetrie: un œdème initial causé par l'injection d'ACF (J2) et un œdème secondaire dû à la polyarthrite (J21) (Figure 45).

Le CXB à la dose de 1 et 3 mg/kg/j et le NPX aux deux doses testées, 10 et 30 mg/kg/j réduisent de façon significative l'œdème de la patte injectée (Figure 45A et B). Néanmoins, ils s'avèrent plus efficaces sur la phase tardive que sur la phase précoce (Tableau 20).

Le CXB inhibe l'œdème de façon dose-dépendante alors qu'il est difficile de différencier les deux doses de NPX.

L'œdème de la patte non injectée devient évident à partir de J15 (Figure 45C et D).

La différence de sévérité observée entre les deux expériences avec le score clinique n'est pas retrouvée avec l'œdème. Ceci démontre que les deux paramètres, œdème et score, ne reflètent pas les mêmes aspects de la maladie.

Le CXB inhibe le développement de l'œdème de la patte non-injectée de façon dose-dépendante. Comme du côté injecté, les deux doses de NPX provoquent le même effet inhibiteur. Le pouvoir inhibiteur des AINS est identique à J15 et à J20.

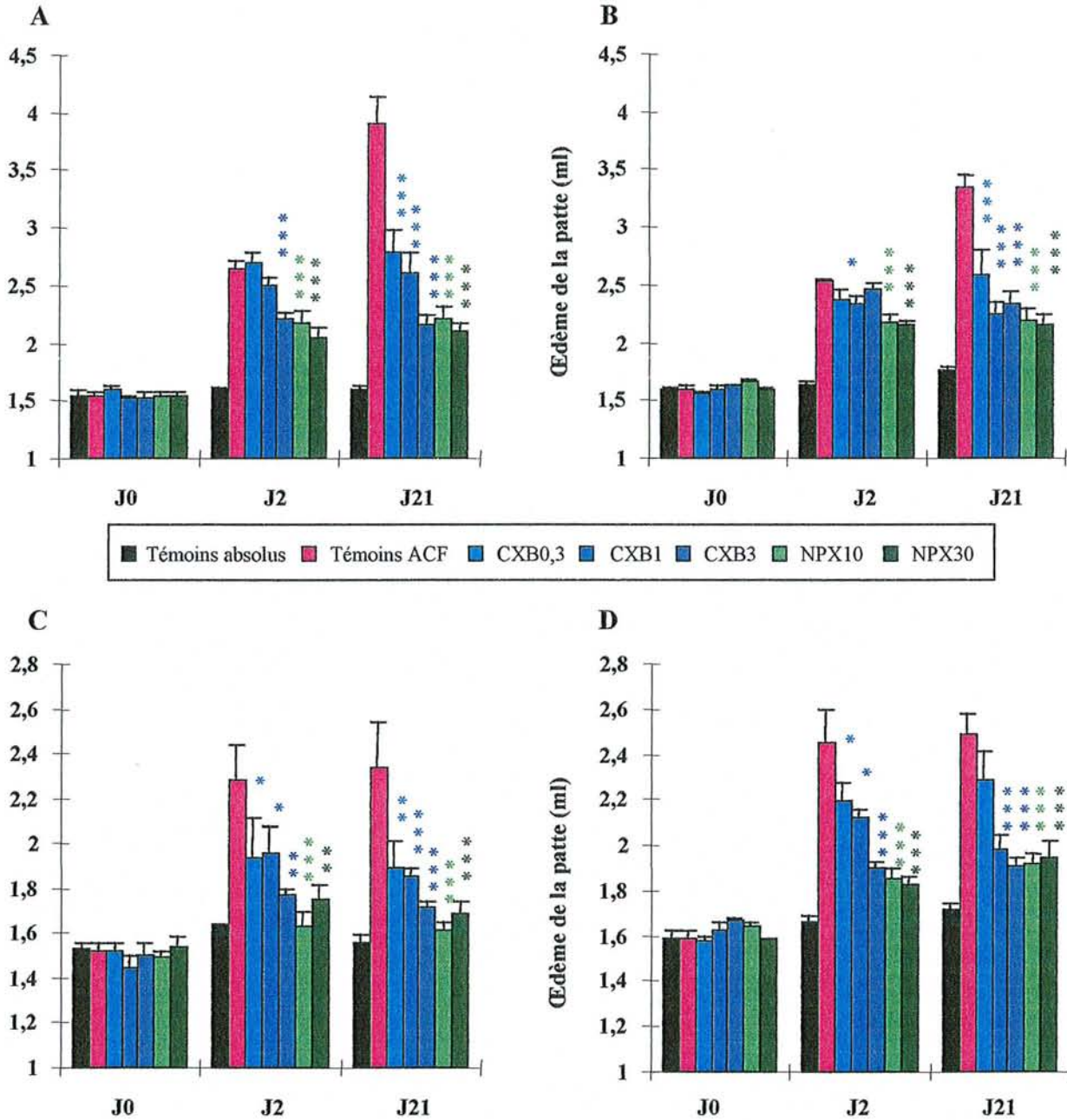


Figure 45 Mesure de l'œdème des pattes postérieures injectées (A et B) et non-injectées (C et D) au cours de la polyarthrite à l'adjuvant. Les mesures sont faites lors de deux expériences (expérience 1 : A et C ; expérience 2 : B et D) (n=5 animaux par groupe) (* : p<0,05 ; ** : p<0,001 ; *** : p<0,005).

Tableau 20 Quantification de l'efficacité des traitements sur l'œdème des pattes postérieures, sur la patte injectée à J2 et sur la patte non-injectée à J21 au cours des deux expériences réalisées (A et B)

		A		B	
		CXB	NPX	CXB	NPX
DE₂₀ J2		1,2	<10	0,8	<10
DE₅₀ J21	I	0,4	<10	0,5	<10
	NI	<0,3	<10	0,8	<10

DE_{20 ou 50} en mg/kg/j: dose efficace permettant de réduire de 20 ou 50% de l'œdème

II.2.1.3. Réduction du handicap fonctionnel

La perte de mobilité spontanée nocturne consécutive à l'induction de l'arthrite par injection d'ACF est biphasique (Figure 46). Elle intervient en deux phases : une phase précoce de courte durée correspondant à la phase inflammatoire aiguë et une phase tardive associée à l'installation de la polyarthrite. La perte de mobilité est maximale à J21.

Les deux expériences réalisées sont très différentes en terme de sévérité.

Le CXB n'exerce qu'un faible effet sur la mobilité au cours de l'expérience la plus sévère (A) alors que le NPX montre un effet plus reproductible au cours des deux expériences.

Il n'est pas possible d'observer d'effet dose-dépendant pour les deux AINS. Les deux molécules s'avèrent beaucoup plus efficaces sur la phase initiale inflammatoire que sur la phase tardive chronique (Tableau 21). De plus, le NPX a une vitesse d'action beaucoup plus rapide que le CXB (N0).

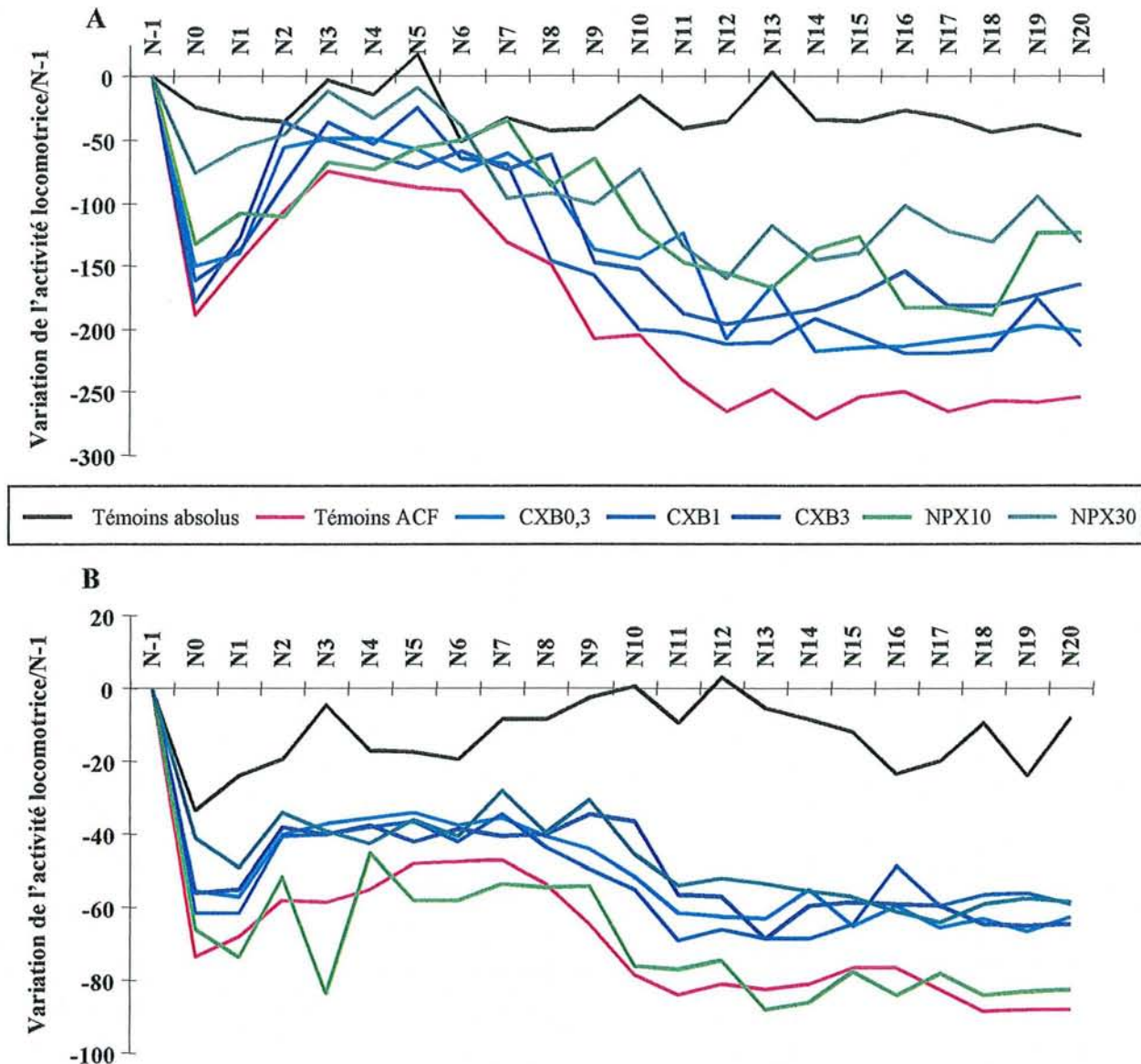


Figure 46 Evolution de la mobilité spontanée au cours de la polyarthrite à l'adjuvant et effet du CXB et du NPX (n=5 animaux par groupe)

Tableau 21 Quantification de l'effet du CXB et du NPX sur la mobilité spontanée nocturne au cours de la polyarthrite à l'ACF

	A		B			
	CXB	NPX	CXB	NPX		
DE₂₀	N0	>3	<10	N0	>3	<10
DE₂₀AUC	N-1/N6	<0,3	20,0	N-1/N3	<0,3	<10
DE₂₀AUC	N7/N20	ND	ND	N4/N20	ND	ND

(DE₂₀ (en mg/kg/j): dose efficace permettant de corriger de 20% la perte de mobilité ; DE₂₀AUC (en mg/kg/j): dose efficace permettant de réduire de 20% l'aire sous la courbe (AUC) de mobilité ; ND : non déterminable)

II.2.1.3. Diminution des marqueurs biologiques de l'inflammation

La production d'IL-6 suit les deux phases observées avec la télémétrie. Elle se décompose en deux pics, un à J2 correspondant à l'inflammation aiguë et un à J21 correspondant à la phase chronique (Figure 47).

Les AINS ne réduisent que modestement les taux d'IL-6 aux fortes doses testées dans les stades précoces (J2 et J6). Par contre, ils permettent une réduction significative au cours de la phase chronique.

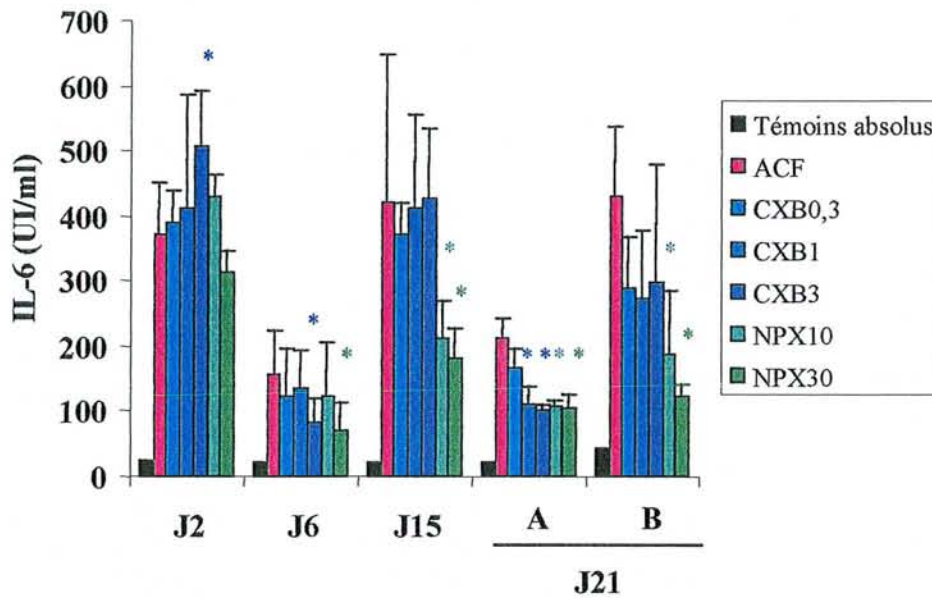


Figure 47 Taux d'IL-6 circulant au cours de la polyarthrite à l'adjuvant et effet des traitements avec CXB et NPX (n=5 animaux par groupe) (* : p<0,05)

II.2.2. Propriétés anti-pyrétiques des molécules

L'évolution de la température corporelle nocturne chez les rats arthritiques montrent une réponse fébrile biphasique, avec un pic précoce (N0) associé à l'inflammation aiguë (sensibilisation par l'injection d'ACF dans le coussinet plantaire droit) et un pic plus tardif (à partir de N10-N11) correspondant à la phase immunologique de la maladie, c'est-à-dire à l'extension de l'arthrite à tous les membres (polyarthrite évidente à partir de J12) (Figure 48). Les deux expériences réalisées ont démontré la même sévérité de la maladie et nous ont permis d'observer une inhibition dose-dépendante des deux pics de fièvre par le CXB et le NPX. Les deux molécules ayant d'ailleurs un même profil d'inhibition avec un effet équivalent du CXB3 et du NPX10.

L'efficacité des deux molécules est plus grande sur la phase tardive (Figure 48), avec une différence beaucoup plus prononcée pour le CXB.

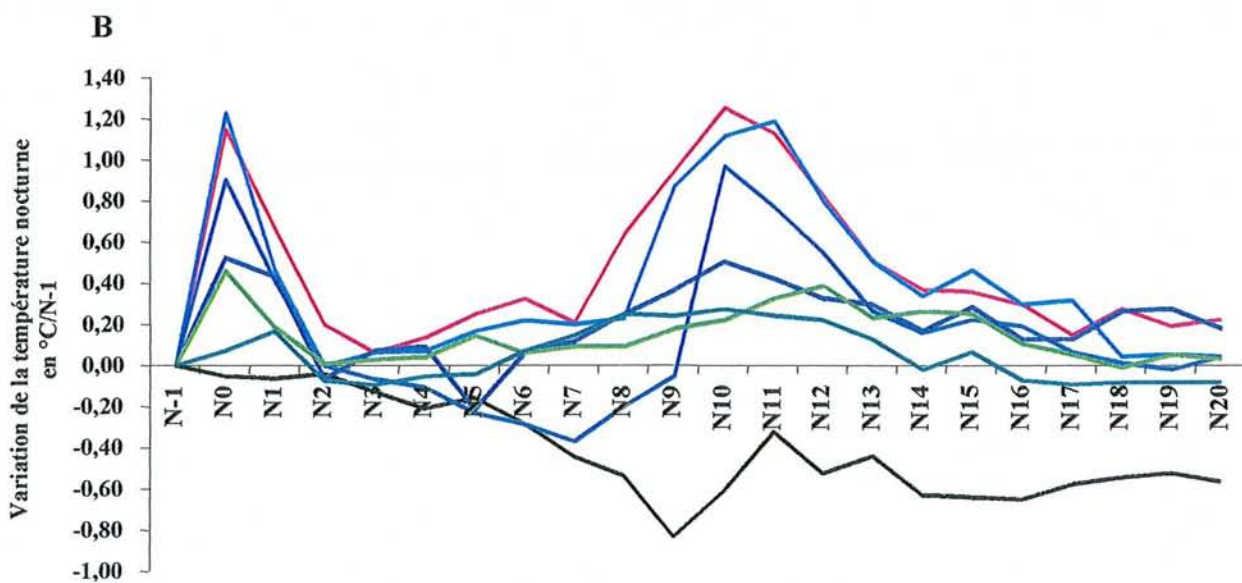
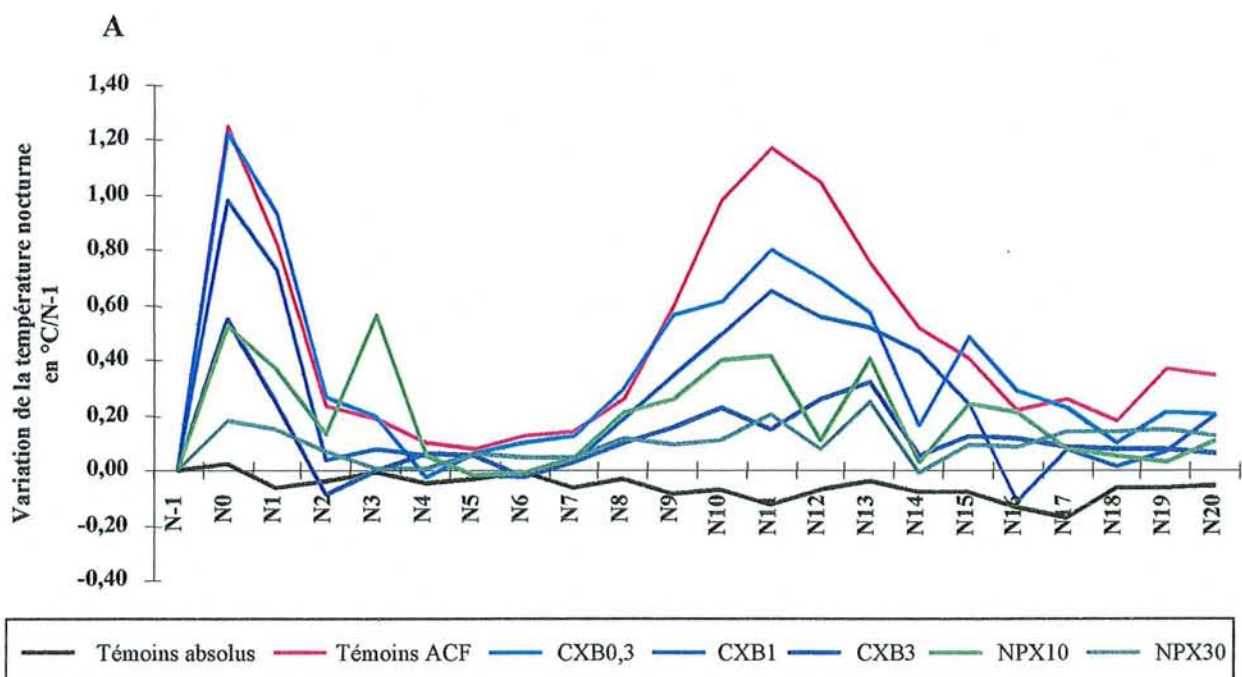


Figure 48 Evolution de la température corporelle nocturne au cours de la polyarthrite à l'adjuvant mesurée au cours de deux expériences (A et B) et effet du traitement par CXB et NPX (n=5 animaux par groupe).

Tableau 22 Quantification de l'efficacité du CXB et du NPX sur la température corporelle nocturne au cours de la polyarthrite par adjuvant

		A		B	
		CXB	NPX	CXB	NPX
DL_{0,5°C}	N0	1,8	<10	N0	2,1
DL_{0,5°C}	N10	0,6	<10	N11	0,5
DE₅₀AUC	N-1/N5	2,0	14,0	N-1/N3	2,0
DE₅₀AUC	N6/N20	1,0	<10	N4/N20	2,0

(DL_{0,5°C} (en mg/kg/j): dose inhibant de 0,5°C l'augmentation de la température corporelle nocturne ; DE₅₀AUC (en mg/kg/j): dose efficace permettant de réduire de 50% l'aire sous la courbe (AUC) de température)

II.2.3. Sélectivité d'inhibition des COXs in vivo

II.2.3.1. Inhibition de la COX plaquettaire par les AINS au cours de la polyarthrite à l'adjuvant

Les taux de TxB₂ dans le sérum des animaux arthritiques augmentent en comparaison à ceux observés dans le sérum des rats témoins, mais de façon non significative (Figure 49). Le CXB est sans effet significatif sur les taux de TxB₂. Cependant, le NPX inhibe la production de TxB₂ de façon significative quel que soit le dosage et à tous les temps étudiés (Tableau 23).

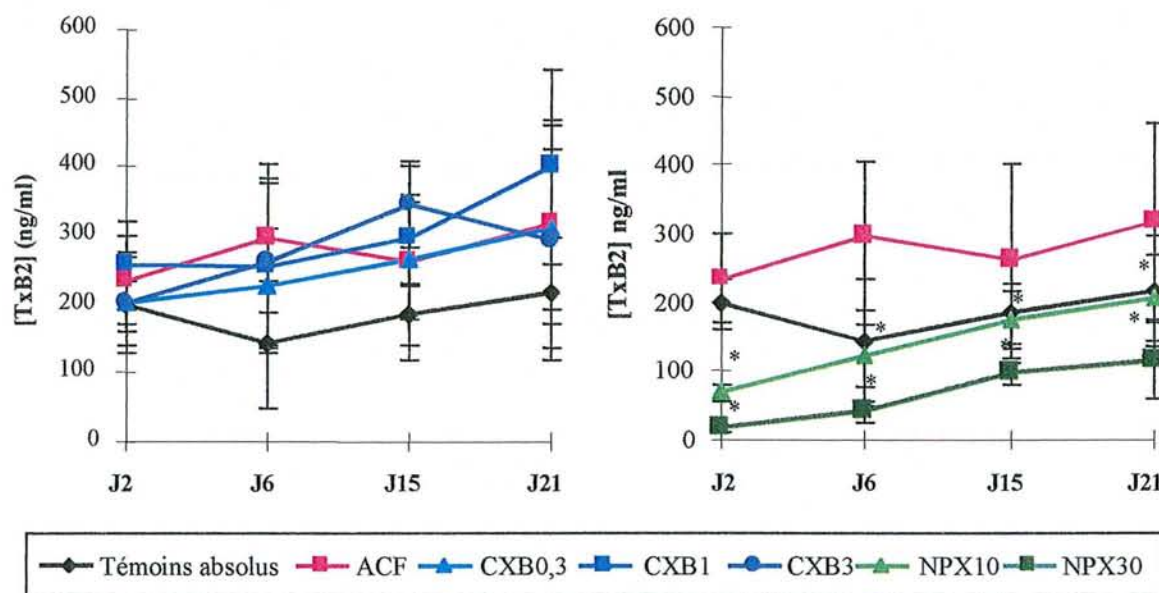


Figure 49 Variation des taux sériques de TxB₂ au cours de la polyarthrite à l'adjuvant et effet du CXB et du NPX (n=6 à 10 animaux par groupe) (* : p<0,05)

Tableau 23 % d'inhibition des taux sériques de TxB₂ par le CXB3 et le NPX10 par rapport aux témoins ACF aux différents stades de la maladie et dose efficace (DE₅₀) permettant l'inhibition de 50% des taux sériques de TxB₂

	% d'inhibition vs ACF		DE ₅₀ (mg/kg/j)	
	CXB3	NPX10	CXB3	NPX10
J2	14	71	>3	<10
J6	12	59	>3	<10
J15	-32	33	>3	<10
J21	8	35	>3	<10

II.2.3.2. Pouvoir inhibiteur des AINS dans les tissus cibles au cours de l'arthrite à l'adjuvant

II.2.3.2.a. Inhibition de la synthèse de PGE₂ dans les pattes inflammatoires

Le contenu en PGE₂ dans les pattes inflammatoires est augmenté de façon significative par rapport aux témoins absolus, dès J2 dans la patte injectée et après J15 dans la patte non-injectée (Figure 50).

Le NPX30 inhibe significativement la production de PGE₂ dans les pattes injectées et non-injectées. Par contre, le CXB3 n'est capable d'inhiber la production de PGE₂ dans la patte non-injectée à J21.

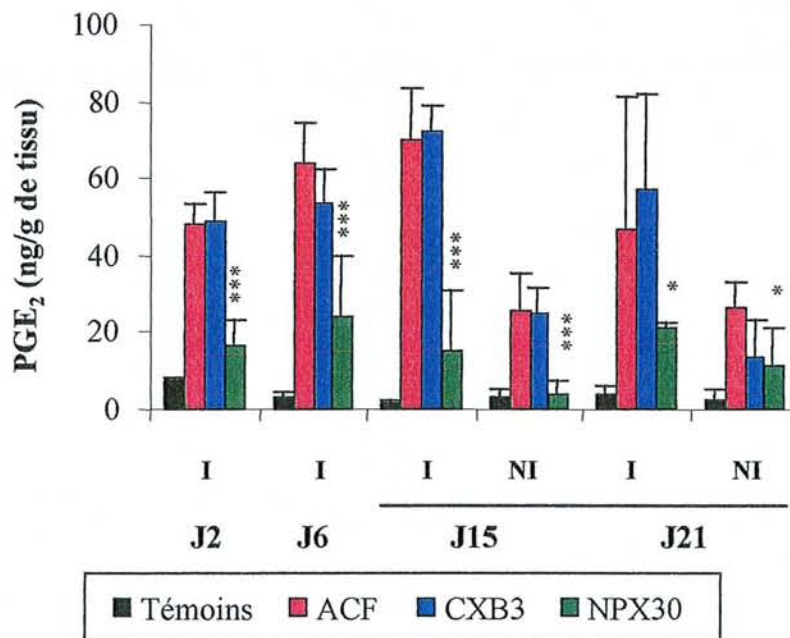


Figure 50 Contenu en PGE₂ dans les pattes inflammatoires à différents temps, sous l'effet du CXB3 et du NPX30, dans les pattes injectées (I) et non-injectées (NI) (n=4 animaux par groupe) (* : p<0,05 ; *** : p<0,005)

II.2.3.2.b. Inhibition de la synthèse de PGE₂ dans la muqueuse gastrique

Le contenu en PGE₂ de la muqueuse gastrique (antre) des rats arthritiques n'est pas différent de celui des rats témoins (Figure 51).

Le CXB aux 3 doses testées n'inhibe à aucun temps le contenu en PGE₂ de la muqueuse gastrique. Par contre, le NPX inhibe de façon significative le contenu en PGE₂ dès les temps les plus précoces (J2 et J6) et à toutes les doses testées (Tableau 24).

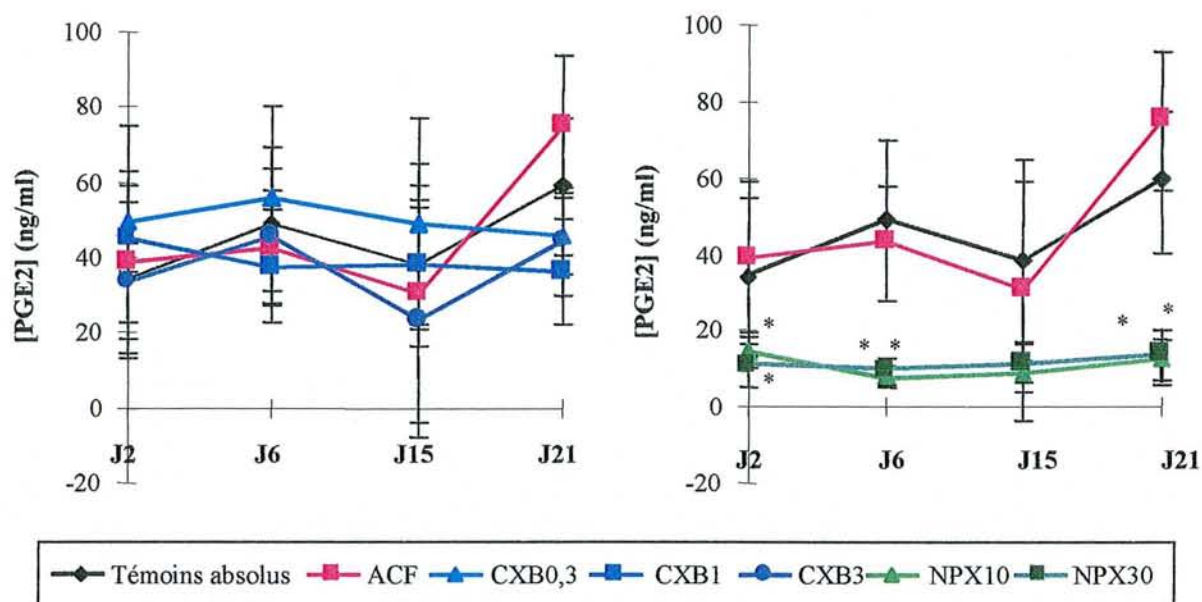


Figure 51 Taux de PGE₂ mesurés dans la muqueuse gastrique (antre) (n=4 animaux par groupe) (* : p<0,05)

Tableau 24 % d'inhibition du contenu de la muqueuse gastrique par le CXB3 et le NPX10 par rapport aux témoins ACF aux différents stades de la maladie et dose efficace (DE₅₀) permettant l'inhibition de 50% du contenu en PGE₂ gastrique

	% d'inhibition vs ACF		DE ₅₀ (mg/kg/j)	
	CXB3	NPX10	CXB3	NPX10
J2	13	62	>3	<10
J6	-1	81	>3	<10
J15	22	70	>3	<10
J21	22	78	>3	<10

II.2.4. Anabolisme des protéoglycanes du cartilage

L'injection d'ACF conduit à une baisse de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage (Figure 52) dès J2 et jusqu'à J21 du côté injecté (patte droite, A et C) aussi bien au centre qu'en périphérie de la rotule. La baisse se produit à partir de J15, au moment où la polyarthrite devient évidente, du côté non-injecté (patte gauche). Le profil d'inhibition de la

synthèse des protéoglycanes dans la zone périphérique est identique à celui de la partie centrale de la rotule.

Globalement les AINS ne semblent pas aggraver la baisse de synthèse des protéoglycanes du cartilage, sauf pour le CXB à la dose de 0,3 mg/kg/j à J6 au niveau de la patte non-injectée dans la partie centrale et pour le NPX 10 mg/kg/j à J6 du côté non-injecté et 30 mg/kg/j à J15 et pour le CXB3 à J21 dans la zone périphérique. Le NPX à 30 mg/kg/j semble d'ailleurs avoir un pouvoir chondroprotecteur au niveau de la partie centrale du côté non-injecté. Ce phénomène a pu être observé dans les deux expériences que nous avons réalisées (A et B) mais n'a pu être vérifié quand le traitement est administré sans Tween 20 dans la CMC (Tableau 25).

Les effets du CXB à la dose de 3 mg/kg/j a des effets comparables à ceux du NPX à la dose de 30 mg/kg/j dans la patte injectée et à ceux du NPX à la dose de 10 mg/kg/j dans la patte non-injectée.

Tableau 25 Baisse d'anabolisme au cours de l'arthrite à l'adjuvant sous l'effet du NPX 30 mg/kg/j administré dans de la CMC 1% ou dans de la CMC 0,5%+ 0,025% Tween 20

% de variation de synthèse des protéoglycanes				
NPX 30				
	CMC 0,5%+Tween 0,025%		CMC 1,0%	
	Injectée	Non-injectée	Injectée	Non-injectée
Zone centrale	-15,2*	-4,2*	-26,7	-19,1
Zone périphérique	-27,5	-24,1	-31,1	-29,9

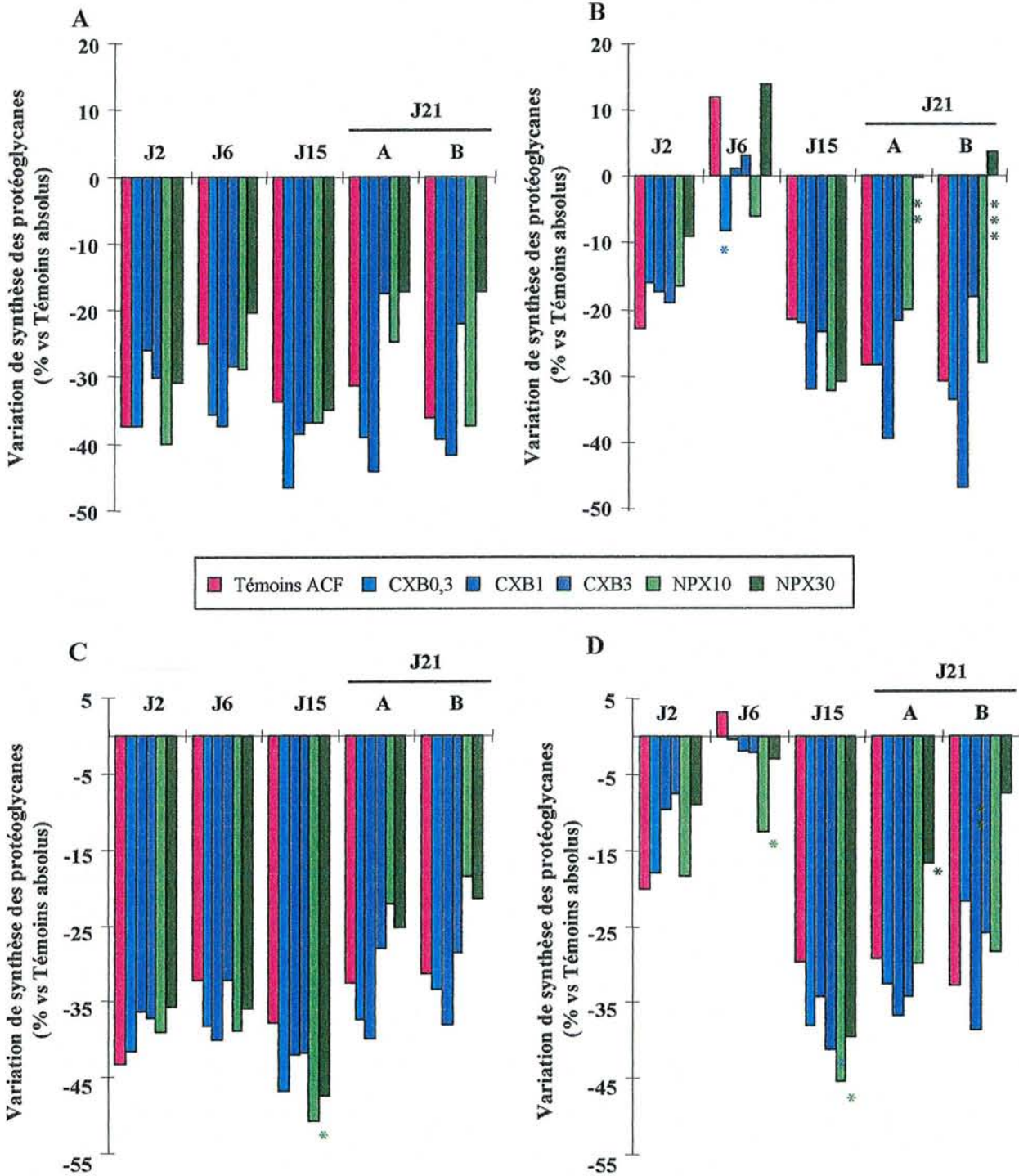


Figure 52 Anabolisme des protéoglycanes du cartilage patellaire mesuré au niveau de la partie centrale (A et B) et périphérique (C et D) du côté injecté (A et C) et non-injectée (B et D) (n=5 animaux par groupe) (* : p<0,05 ; ** : p<0,001 ; *** : p<0,005)

Discussion de la 1^{ère} et de la 2^{ème} parties

Cette étude nous a permis de comparer les effets du méloxicam, inhibiteur réputé préférentiel de COX-2, et du célécoxib, inhibiteur réputé sélectif de COX-2 à ceux du naproxène, à la fois sur des critères d'efficacité thérapeutique et de tolérance digestive, chez des animaux polyarthritiques traités au long cours. Cette expérience reproduit donc assez fidèlement les conditions d'utilisation clinique de ces molécules.

Nous avons montré que la tolérance globale des trois traitements est bonne, y compris aux plus fortes posologies étudiées (méloxicam 3 mg/kg/j, célécoxib 3 mg/kg/j ou naproxène 30 mg/kg/j). L'absence évidente de toxicité est d'ailleurs confirmée par l'évolution pondérale favorable des animaux et l'absence de diminution importante du volume splénique. Nos résultats suggèrent également que le méloxicam et le naproxène n'interfèrent que faiblement sur les processus dysimmunitaires puisqu'ils ne retardent pas l'apparition de la maladie et ne modifient pas son incidence. Ainsi, les scores de sévérité d'arthrite et l'apparition de l'œdème sur la patte arrière non injectée montrent que la polyarthrite apparaît vers le 12^{ème} jour dans tous les groupes.

Nous avons comparé les propriétés anti-inflammatoires des molécules dans les différents modèles par l'évaluation de différents paramètres, comme la mesure de l'œdème (des pattes postérieures pour la polyarthrite à l'adjuvant ou du genou dans le cas de la monoarthrite au zymosan), la réduction du handicap fonctionnel (par la mesure de la mobilité nocturne des animaux par biotéléométrie) ou encore par la mesure d'un marqueur biologique de la réaction inflammatoire (mesure des taux circulants d'IL-6).

Les trois AINS se sont avérés efficaces sur tous les paramètres d'évaluation de la sévérité de la polyarthrite, même si les doses efficaces sont différentes pour les trois molécules selon le critère considéré. Ainsi, les posologies efficaces du méloxicam, du célécoxib et du naproxène (DI_{50} = concentration inhibant 50 % de l'œdème) sur l'œdème de la patte arrière non injectée à J21 sont respectivement de 0,24 mg/kg/j, de 0,40 et de 7,34 mg/kg/j. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Geis et coll, 1999) qui donne une DE_{50} de 0,3 mg/kg pour le célécoxib dans le modèle de polyarthrite à l'adjuvant.

Ces résultats montrent que les posologies efficaces sur le score clinique sont nettement supérieures à celles actives sur l'œdème puisque seules des DI_{20} (doses réduisant l'œdème de 20%) ont pu être calculées. Cette différence peut provenir du fait que l'œdème des pattes antérieures n'est pas mesurable alors que cette atteinte est prise en compte dans le score de sévérité. De plus, l'évaluation du score de sévérité reste semi-quantitative et est donc sujette à plus de fluctuation que la mesure pléthysmométrique.

D'autre part, il nous a été possible de différencier les AINS quant à leur efficacité sur la réduction du handicap fonctionnel. Les effets des trois AINS sont en effet différents entre les phases précoce et tardive de la polyarthrite. Ainsi, le méloxicam et le célécoxib n'ont pas d'effet au cours de la phase précoce (J0-J4) alors que leur efficacité est plus grande au cours de la phase secondaire (J5-J21). En revanche, le naproxène a une efficacité constante au cours du développement de la maladie, ce qui pourrait être lié en partie à ses caractéristiques pharmacocinétiques. En effet, le méloxicam atteint son état d'équilibre pharmacocinétique en

4 à 5 jours alors que 2 jours de traitement sont suffisants pour que l'équilibre soit atteint avec le naproxène.

L'hypomobilité est un paramètre multifactoriel, permettant de prendre en compte à la fois la douleur, l'inflammation et les phénomènes centraux associés à la réaction fébrile. Ceci a été démontré par la capacité d'agent algogène non inflammatoire comme le formol et d'agent pro-inflammatoire et pyrogène, comme l'IL-1, à générer une hypomobilité chez l'animal sain (Terlain et coll, 1993). Les trois AINS corrigent modérément l'hypomobilité associée à la polyarthrite (phase tardive). Ce critère est d'une grande pertinence clinique mais son involution, même partielle, ne peut être observée qu'avec des molécules faisant preuve d'une grande efficacité pharmacologique (Gegout Pottie et coll, 1999). Ce paramètre pourrait davantage relever de phénomènes hyperalgiques qu'inflammatoires même si cela semble peu cohérent avec l'effet antalgique précoce rapporté par Laird et collaborateurs (1997) pour le méloxicam.

Ces observations ont été confirmées par l'évaluation des propriétés anti-pyrétiques des molécules. En effet, l'efficacité du méloxicam semble augmenter au cours du temps (la $DI_{1,0^{\circ}C}$ n'est pas déterminable avec les doses testées pour le 1^{er} pic fébrile et est de 0,35 mg/kg/j pour le 2^{ème} pic fébrile) alors que le naproxène exerce un effet quasiment constant (5,04 mg/kg/j pour le 1^{er} pic et 4,47 mg/kg/j pour le second). Le célécoxib a un effet beaucoup plus modeste que les deux autres molécules sur la fièvre, puisque seules des $DI_{0,5^{\circ}C}$ ont pu être calculées. Cependant, la même tendance est observée qu'avec le méloxicam : le célécoxib est inefficace sur la phase précoce ($DI_{0,5^{\circ}C}=1,8$ à $2,1$ mg/kg/j sur le pic précoce) et son efficacité augmente au cours du temps ($DI_{0,5^{\circ}C}=0,5$ à $0,6$ mg/kg/j sur le pic tardif). Les résultats obtenus pour le méloxicam sont différents de ceux publiés par Engelhardt et collaborateurs (1995) qui rapportent une $DI_{1,0^{\circ}C}$ de 9,01 mg/kg pour le méloxicam et de 8,18 mg/kg pour le naproxène. Il faut cependant remarquer que les conditions expérimentales sont différentes puisque ces valeurs ont été déterminées chez le rat dans un modèle aigu de fièvre induite par la levure de bière, avec une évaluation 2 heures après l'administration des médicaments. Dans la polyarthrite par adjuvant, la phase précoce est parfois utilisée comme un modèle d'inflammation aiguë pour comparer les AINS, mais seule la phase tardive immunologique est le reflet de la polyarthrite. C'est donc cette phase qu'il faut considérer en priorité.

Les variations des taux circulants d'IL-6 confirment les deux phases de la maladie observées avec la fièvre : une phase aiguë caractérisée par un pic à J2 et une phase chronique avec un maximum à J12. De plus, l'effet des trois molécules sur ce paramètre semble coïncider avec leur efficacité globale. En effet, le méloxicam est efficace sur la phase tardive uniquement, contrairement au naproxène qui est capable de réduire les taux d'IL-6 dès le stade précoce. Cependant, le célécoxib n'inhibe pas de façon significative les taux circulants d'IL-6. Ces résultats confirment que les taux circulants d'IL-6 sont un bon reflet de la sévérité de la polyarthrite et de sa modulation par les traitements (Anderson et coll, 1996 ; Leisten et coll, 1990 ; Thiesen-Popp et coll, 1992).

L'étude de la sélectivité d'inhibition des COXs *in vivo* devait se faire d'une part dans le système du sang total par la mesure de l'inhibition de la production de TxB_2 par la COX-1

plaquettaire et de PGE₂ par la COX-2 leucocytaire, et d'autre part par l'évaluation de pouvoirs inhibiteurs tissulaires par la mesure de l'inhibition de la synthèse des PGE₂ au niveau de la muqueuse gastrique (activité COX-1) et de la patte inflammatoire (activité COX-2).

Au cours de l'étude de la sélectivité d'inhibition des COXs dans le système sang total *ex vivo*, nous n'avons pas observé d'induction spontanée de COX-2 leucocytaire par le processus inflammatoire. Nous n'avons pas réussi à induire l'expression de COX-2 à l'aide de LPS, ce qui ne confirme pas les travaux de Wallace et collaborateurs (1998). Nous n'avons pas d'explication rationnelle à cette discordance, même si l'inhibition de COX-2 *ex vivo* est un paramètre très peu utilisé chez le rat alors qu'elle est classiquement déterminée chez l'homme (Panara et coll, 1999). Une alternative serait de mesurer l'inhibition de COX-2 *ex vivo* après avoir induit son expression par une injection intrapéritonéale de LPS (Lesch et coll, 1998). Ces résultats sont cohérents avec l'absence d'induction spontanée de la COX-2 leucocytaire rapportée chez des patients porteurs de polyarthrite rhumatoïde (Schulze-Koops et coll, 1997).

Cependant, nous avons pu mettre en évidence un effet inhibiteur dose-dépendant du méloxicam et du naproxène de la COX-1 plaquettaire. En effet, les deux molécules sont capables d'inhiber une fonction dépendant majoritairement de la COX-1 plaquettaire avec des DI₅₀ (dose inhibant 50 % de la production de TxB₂ calculé à partir de l'aire sous la courbe entre J0 et J21) de 0,30 mg/kg/j pour le méloxicam et 7,29 mg/kg/j pour le naproxène. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés pour le méloxicam (0,47 mg/kg) (Engelhardt, 1996), même si, dans cette étude, la CI₅₀ avait été déterminée 3 heures après l'administration orale du médicament. En revanche, le célécoxib s'est avéré inefficace sur ce paramètre, ce qui confirme la pertinence de la classification des AINS établie chez l'homme (Lipsky et coll, 1998). Même si la biosynthèse du TxB₂ peut être inhibée de plus de 50% sans que cela ne modifie le temps de saignement ou les tests d'agrégation plaquettaire (DeMeijer et coll, 1999), nos résultats confirment la différence qui existe entre les inhibiteurs préférentiels ou sélectifs de COX-2. L'absence d'inhibition de la COX-1 plaquettaire est d'ailleurs cohérente avec le risque potentiel de thrombose que l'on attribue possiblement aux inhibiteurs sélectifs de COX-2 (Bombardier et coll, 2000 ; Mukherjee et coll, 2001). Ces derniers seraient par ailleurs susceptibles de favoriser l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (Muscara et coll, 2000) et de diminuer la biosynthèse de la prostacycline *in vivo* (McAdam et coll, 1999). Qui plus est, nos précédents travaux (Blain et coll, sous presse) ont montré les limites de l'évaluation des pouvoirs inhibiteurs des AINS dans le système du sang total *ex vivo*. C'est pourquoi, il nous paraissait pertinent d'évaluer des pouvoirs inhibiteurs tissulaires.

L'étude du contenu en PGE₂ des pattes inflammatoires nous a permis de distinguer les AINS. En effet, seul le méloxicam est capable d'inhiber efficacement la production de prostaglandines au site inflammatoire et de façon plus marquée du côté non injecté que du côté injecté. L'évolution des DI₅₀ du méloxicam entre J16 (1,16 mg/kg/j du côté injecté et 0,81 mg/kg/j du côté non-injecté) et J21 (0,87 mg/kg/j du côté injecté et 0,26 mg/kg/j du côté non-injecté) est le reflet de l'augmentation de son efficacité. Dans les mêmes conditions expérimentales, le naproxène et le célécoxib apparaissent très peu efficaces sur ce paramètre. Ceci ne semble pas coïncider avec l'efficacité observée avec ces molécules sur d'autres

paramètres tel que l'œdème. Ce résultat laisse donc supposer que l'œdème n'est pas un phénomène dépendant uniquement des prostaglandines ou que les concentrations efficaces d'AINS sont différentes de celles procurant une inhibition notable des prostaglandines (Wallace, 1999), ce qui suggérerait la contribution d'autres mécanismes d'action des AINS (Abramson et Weissmann, 1989). Cependant, il est important de noter la grande hétérogénéité des résultats qui ne permet pas d'atteindre le seuil de significativité statistique.

L'étude de la muqueuse digestive nous a permis de montrer que les rats arthritiques ont un contenu gastrique en PGE₂ inférieur à ceux des témoins absolus. Ceci suggère que les rats malades auraient une cytoprotection gastrique moins efficace. Il nous a également été possible de distinguer les trois AINS sur ce paramètre. En effet, le méloxicam et le naproxène inhibent le contenu gastrique en PGE₂ de façon dose-dépendante, cet effet semblant s'atténuer avec le temps de traitement pour les 2 AINS. Lorsque le pouvoir inhibiteur est considéré sur l'ensemble de la maladie (J0 à J21), le méloxicam inhibe 50% des PGE₂ gastriques à une posologie de 0,78 mg/kg/j et le naproxène à une posologie de 14,94 mg/kg/j. Lorsque la sévérité de la polyarthrite est maximale (J21), la dose inhibant 50 % des PGE₂ dans la muqueuse gastrique est de 1,22 mg/kg/j pour le méloxicam et de 16,33 mg/kg/j pour le naproxène. En revanche, le célécoxib n'inhibe à aucun moment et à aucune dose testée, le contenu gastrique en PGE₂. Les valeurs obtenues pour le méloxicam sont différentes de celles de la littérature (Engelhardt, 1995) où l'on retrouve une UD₅₀ (dose provoquant une ulcération chez 50 % des animaux) de 2,47 pour le méloxicam et 11,1 mg/kg/j pour le naproxène. D'autre part, des CI₅₀ de 8,38 mg/kg/j pour le méloxicam et de 3,56 mg/kg/j pour le naproxène ont été rapportées en évaluant la concentration en PGE₂ dans le suc gastrique dans un modèle de ligature pylorique (Engelhardt et coll, 1996). Ces différences peuvent s'expliquer par les conditions expérimentales, puisque dans le modèle de ligature, l'effet a été mesuré 6 heures après une administration unique des médicaments. La pharmacocinétique des molécules peut donc influencer ces résultats de façon beaucoup plus importante que lors de notre traitement au long cours. D'autre part, même si le pouvoir ulcérogène a été déterminé après 3 jours de traitement (Engelhardt et coll, 1995), les animaux n'étaient pas arthritiques et ont donc probablement une tolérance digestive différente. Notons enfin que le pouvoir inhibiteur sur la synthèse des PG est une condition nécessaire mais non suffisante pour générer des ulcères (Goldin et coll, 1988). Toutes ces différences et l'administration biquotidienne de naproxène (plus proche de la réalité clinique mais peu étudiée en tant que telle chez le rat) qui est favorable à la cytoprotection adaptative, permettent d'expliquer pourquoi nos résultats montrent un pouvoir inhibiteur plus important pour le méloxicam et moins intense pour le naproxène.

L'évaluation de nos paramètres d'efficacité thérapeutique et de tolérance digestive permet, chez les rats arthritiques, de définir des index de tolérance (« safety index ») pour les deux AINS. Ces index prennent en compte le pouvoir inhibiteur (DI₅₀) des deux molécules au niveau des pattes inflammatoires et de la muqueuse digestive chez les mêmes animaux et à différents temps de traitement. Les résultats obtenus montrent des index plus favorables pour le méloxicam que pour le naproxène. La majorité des index utilisés dans la littérature compare des activités chez des rats malades, en terme d'efficacité, et des rats sains, en terme de tolérance, et il a été montré avec des inhibiteurs sélectifs de COX-2 (Futaki et coll, 1993) que

la valeur de l'index varie selon les paramètres considérés. Par conséquent, nos index de tolérance (0,2 à J21) semblent moins favorables pour le méloxicam que les données retrouvées dans la littérature [0,05 à J21 (Engelhardt et coll, 1995)], mais ils présentent l'avantage de prendre en compte la variation de deux paramètres chez un même animal traité au long cours, de considérer l'influence de la pathologie athritique à la fois sur la tolérance digestive et la pharmacocinétique des AINS, et de concerner une administration des médicaments à des posologies « thérapeutiques ». L'index favorable que nous avons obtenu pour le méloxicam à J21 semble d'avantage dû à une augmentation de son efficacité qu'à une amélioration de sa tolérance digestive. Cependant, il est en faveur d'un meilleur index thérapeutique que pour le naproxène, d'autant que l'administration de ce dernier en deux demi doses quotidiennes a pu influencer favorablement sa tolérance digestive.

Nous avons étudié pour la première fois l'effet de ces trois AINS sur le cartilage *ex vivo*. Le cartilage patellaire est très représentatif de l'atteinte cartilagineuse au cours des processus inflammatoires ou dégénératifs et permet d'évaluer les potentialités chondroprotectrices des molécules (Van den Berg et coll, 1982). Nos résultats montrent que l'inhibition de la biosynthèse des protéoglycanes générée par l'arthrite (aiguë dans le cas du zymosan ou chronique dans le cas de l'adjuvant) n'est pas accentuée par les médicaments (effet non reproductible et indépendant de la dose pour le naproxène, absence d'effet aggravant pour le méloxicam). A l'inverse, les AINS corrigent transitoirement et partiellement l'inhibition d'anabolisme du cartilage associée à la polyarthrite (patte non injectée). Ces résultats suggèrent que ces deux AINS n'ont pas d'effets marquants sur le métabolisme du cartilage, ce qui tend à confirmer la « chondroneutralité » suggérée par des études *in vitro*. Ainsi, des études menées avec des chondrocytes humains (Basleer et coll, 1997) ou des explants de cartilage porcine (Rainsford et coll, 1997) ont montré que le méloxicam et le naproxène n'ont pas d'effets délétères ou favorables sur la biosynthèse des constituants matriciels (protéoglycanes, collagène II). Ces résultats sont d'ailleurs cohérents avec les premières données disponibles avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2 chez l'homme, qui ne montrent ni modification de la biosynthèse des protéoglycanes dans des cocultures de cartilage et de cellules inflammatoires (Mastbergen et coll, 2000), ni aggravation du pincement de l'interligne articulaire chez des patients arthrosiques traités pendant un an (Tindall, 2000).

Etude expérimentale
3^{ème} partie

***Effet d'un inhibiteur sélectif de COX-2,
Rofécoxib, sur l'apoptose
chondrocytaire dans l'arthrose
expérimentale au MIA chez le rat***

MATERIEL ET METHODE

I. Animaux et traitements

I.1. Animalerie

Les rats Wistar mâles (Charles River, France) pesant 150-175 g sont placés dans des cages par groupe de quatre avec nourriture et boisson à volonté. Ils sont hébergés dans une animalerie ventilée et thermorégulée à $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, bénéficiant de cycles de 12 heures d'éclairage et de 12 heures d'obscurité. Les animaux sont acclimatés au moins 5 jours au laboratoire avant toute expérimentation.

Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale après anesthésie par une injection intrapéritonéale d'un mélange d'hydrochlorure de kétamine (Imalgène®, 50 mg/kg) et d'acépromazine (Vétranquil®, 1,25 mg/kg).

I.2. Induction de l'arthrose

L'arthrose est induite comme décrite par Guingamp et coll, 1997, par l'injection intra-articulaire bilatérale de 0,03 mg de monoiodoacétate (MIA, Merck-Clévenot, Nogent sur Marne, France) sous 50 μl de sérum physiologique. La solution est filtrée avec un filtre 0,20 μm (Sartorius) avant l'injection.

I.3. Traitements

Les solutions administrées aux animaux sont préparées dans une solution aqueuse à 0,5% de CMC (Prolabo, France) contenant 0,025% de Tween 20 (Sigma). Les traitements sont administrés par gavage, à l'aide d'une sonde gastrique, à raison de 1 ml par 100 g de poids corporel. Le traitement débute à J0, jour de l'injection de MIA, une heure avant l'induction. Le rofécoxib (Merck-Frosst) est utilisé aux doses de 0,75 et 3 mg/kg/j, administrées en une seule fois et le naproxène, utilisé comme comparateur, est administré deux fois par jour à la dose de 10 mg/kg/j. Les animaux témoins arthrosiques, induits au MIA, et les animaux témoins sains reçoivent l'excipient deux fois par jour.

II. Etude de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage patellaire

Les rotules sont prélevées juste après le sacrifice de l'animal et traitées comme décrit précédemment pour l'étude de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage patellaire par l'incorporation *ex vivo* de sulfate radiomarqué (voir page 104).

III. Etude histologique

III.1. Préparation des spécimens

Les études immunohistochimiques sont réalisées sur les genoux entiers des animaux témoins et arthrosiques, ayant ou non reçu un traitement. Les articulations sont prélevées le jour du sacrifice des animaux, soit 10, 15 ou 20 jours après l'injection de MIA.

Les spécimens sont tout d'abord fixés dans 4% de paraformaldéhyde pH 7,4 pour 24 heures puis décalcifiés selon la procédure suivante. Les échantillons sont lavés à l'eau courante pendant 30 minutes puis placés dans du RDO (Rapid Bone Decalcifier, Apex engineering, Plainfield, IL) pendant 3 heures. Ensuite les spécimens sont rincés dans l'eau courante pendant 30 minutes. Les prélèvements sont à nouveau fixés pendant 24 heures avant d'être déshydratés (Tissue Tek, Vip, Miles Scientific, Bayer Diagnostic) et inclus dans la paraffine (Tissue Tek, TEC, Sakura, Bayer Scientific) de manière à effectuer des coupes frontales de l'articulation, perpendiculairement à la surface du cartilage.

Les coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome Leica RM2135 (Leica) et placées sur des lames Superfrost (CML, France).

Pour toutes les études histologiques, les spécimens sont déparaffinés dans du TissueClear (Bayer Diagnostic) et réhydratés dans des bains d'alcool de grade décroissant dans un appareil à coloration Tissue Tek DRS, Sakura (Bayer Diagnostic).

III.2. Colorations histologiques

III.2.1. Bleu de toluidine

Le bleu de toluidine est une coloration permettant la mise en évidence des glycosaminoglycanes sulfatés. La coloration est réalisée par un bain de 5 min dans une solution de bleu de toluidine à 1% après avoir déparaffiné et réhydraté les coupes. Les lames sont ensuite plongées dans un bain d'acétone, dans un bain d'alcool 100% puis deshydratées et montées au Vogel (Bayer Diagnostic).

III.2.2. Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)

Cette coloration permet d'étudier la morphologie des cellules du cartilage articulaire. Les lames sont plongées dans une solution d'hématoxyline à 0,5% pendant 5 minutes, puis rincées à l'eau. Elles sont ensuite passées dans l'alcool ammoniacal pendant 1 min (permettant de différencier le noyau du reste de la cellule). Elles sont ensuite colorées dans l'éosine aqueuse à 1% pendant 5 min, afin de mettre en évidence les éléments acidophiles comme le cytoplasme. Après avoir été rincées, déshydratées dans de l'alcool à 95%, elles sont enfin colorées dans une solution alcoolique de safran à 1%. Les lames sont déshydratées et montées dans le Vogel (Bayer Diagnostic).

III.2.3. Score histologique de sévérité

Le score de sévérité d'arthrose a été adapté du score de Mankin (Mankin et coll, 1971) et prend en compte les paramètres énumérés dans le Tableau 26. Il est évalué en prenant en compte différents paramètres aussi bien au niveau du cartilage (structure (Figure 53), cellularité...) que de l'os sous-chondral sur les coupes colorées au bleu de toluidine et à l'HES.

Tableau 26 Grille d'évaluation du score histologique de sévérité d'arthrose

<u>Cartilage</u>	
<i>Structure (surface)</i>	
Normale	0
Irrégulière	1
Fissures jusqu'à la zone de transition	2
Fissures jusqu'à la zone radiale	3
Fissures jusqu'à la zone calcifiée	4
Désorganisation complète	5
<i>Cellules (répartition)</i>	
Normale	0
Hypercellularité	1
Clusters	2
Hypocellularité	3
Hypocellularité et clusters	4
<i>Coloration au bleu de toluidine</i>	
Homogène et intense (normale)	0
Décoloration faible diffuse ou localisée	1
Décoloration modérée diffuse ou intense localisée	2
Décoloration intense diffuse	3
Pas de coloration	4
<i>Epaisseur de la couche de chondrocytes hypertrophiques</i>	
Normale	0
Diminution faible	1
Diminution modérée	2
Diminution totale	3
<u>Remaniements osseux</u>	
Pas de remaniement	0
Remaniement	1
Ostéolyse	0
Pas d'ostéolyse	1

Le score est évalué sur chaque condyle fémorale et chaque plateau tibial des coupes histologiques appartenant aux différents groupes (contrôle, MIA, traités ou non) et aux différents temps (J10, J15 et J20).

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne±sem pour chaque groupe (comportant 4 plateaux tibiaux et 4 condyles fémoraux). Le score des animaux appartenant au groupe contrôle (rat non induit, traité avec placebo) est de zéro.

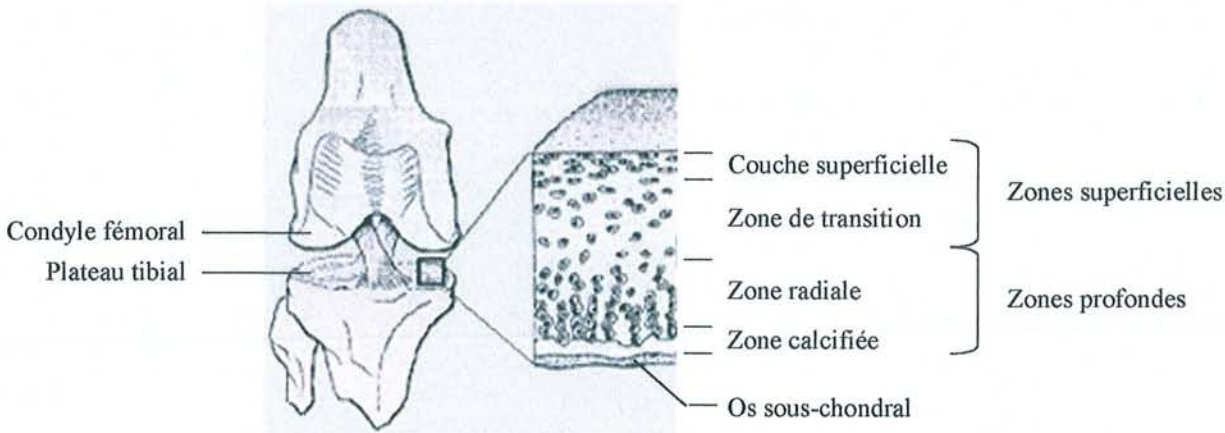


Figure 53 Représentation schématique du cartilage. Distinction des différentes zones.

IV. Etude de l'effet de l'inhibition sélective de COX-2 sur l'apoptose chondrocytaire

IV.1. Détection de l'apoptose *in situ*

La détection de l'apoptose est réalisée avec le kit *in situ* cell death detection kit, POD (Roche). Brièvement, les coupes sont déparaffinées pendant 15 minutes dans du tissu clear (Bayer Diagnostic), puis réhydratées dans des bains d'alcool de grade décroissant (100, 95, 70 et 50%) (5 minutes chaque). Les coupes sont rincées dans un bain d'eau distillée puis plongées dans du PBS pH 7,4 (Eurobio). Les coupes sont ensuite digérées pendant 45 minutes à 37°C par 0,25 unité/ml de chondroïtinase ABC (Sigma) dans du PBS pH 8,0, puis perméabilisées dans un bain à 0,3% de Triton X100 (Sigma) pendant 20 minutes à température ambiante. Elles sont enfin digérées pendant 20 minutes à 37°C par de la protéinase K (20 µg/ml ; Sigma). Les spécimens sont incubés pendant 10 minutes à température ambiante dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% (Acros Organics) afin d'inhiber d'éventuelles peroxydases endogènes. Les lames sont lavées entre chaque étape dans du PBS pH 7,4 à trois reprises. La fragmentation de l'ADN est détectée par l'extension des extrémités de l'ADN par une terminal deoxynucleotidyltransférase avec des nucléotides couplés à la fluoréscéine. La fluoréscéine est ensuite reconnue par un conjugué couplé à la peroxydase. Le marquage est révélé par ajout du substrat de la peroxydase (Liquid DAB substrate kit, Novocastra, Tebu, France) contenant du peroxyde d'hydrogène et du chlorure de nickel (pour intensifier le marquage) (Figure 54). Les coupes sont contrecolorées dans le vert de méthyle et montées de façon permanente avec Eukit (Labonord).

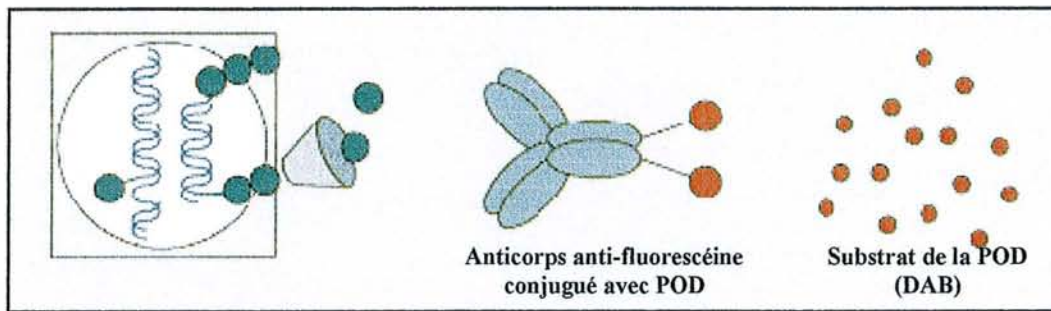


Figure 54 Représentation schématique de la détection *in situ* de la mort cellulaire, avec le kit Roche

Trois types de contrôles internes sont réalisés : i) contrôle positif à la DNase 1 U/ml (Promega) dans un tampon Tris, incubée pendant 10 minutes à 37°C ; ii) deux contrôles négatifs (omission du mélange réactionnel nucléotides biotinylés et TdT ou omission du conjugué).

IV.2. Immunodétection de la caspase-3 active, de la COX-2 et de la iNOS dans le cartilage articulaire

Les coupes sont déparaffinées et réhydratées, puis traitées pour la détection immunohistochimique comme décrit précédemment (Pelletier et coll, 1999 ; Boileau et coll, sous presse) avec quelques modifications. Elles sont ensuite perméabilisées par une digestion de 90 minutes à 37°C par 0,25 unités/ml de chondroïtinase ABC pH 8,0 (Sigma), puis incubées pendant 30 minutes dans une solution à 3% de Triton X100 (Sigma) dans du PBS pH 7,4. Les spécimens sont incubés pendant 18 heures à 4°C avec les différents anticorps, après avoir été bloqués avec du sérum normal de chèvre pendant 90 minutes. Les lames sont alors rincées et incubées en présence d'un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé contenu dans le kit de détection (Novostain Super ABC kit, Novocastra, Tébu) puis avec le conjugué anti-biotine couplé à la peroxydase, après avoir incubé les lames dans une solution à 3% de peroxyde d'hydrogène (Acros Organics) pendant 10 minutes à température ambiante.. Les deux incubations se font à température ambiante pendant 45 minutes. Le marquage est révélé par une solution de DAB contenant du peroxyde d'hydrogène et du chlorure de nickel (Liquid DAB substrate kit, Novocastra, Tébu).

L'anticorps anti-COX-2 (H-62) (sc-7961; 200 µg/ml, Santa Cruz) est utilisé au 1/20. Il s'agit d'un anticorps polyclonal produit par immunisation de lapin, reconnaissant la région allant du résidu 55 au 111 de la COX-2 humaine. Il réagit spécifiquement avec la COX-2 de rat.

L'anticorps anti-NOS2 (H-174) (sc-8310; 200 µg/ml, Santa Cruz) est utilisé au 1/75. Il s'agit d'un anticorps polyclonal produit par immunisation de lapin, reconnaissant la région allant du résidu 2 à 175 de la NOS2 d'origine humaine. Il reconnaît spécifiquement la NOS2 de rat.

L'anticorps anti-caspase-3 (R&D, 100 µg/ml) est utilisé au 1/200. Il s'agit d'un anticorps polyclonal produit par immunisation de lapin, reconnaissant la région allant du résidu 163 à 175 de la caspase-3 active d'origine humaine.

Différents contrôles de spécificité sont réalisés : i) omission du premier anticorps ; ii) substitution du premier anticorps par un sérum pré-immun autologue.

Les coupes sont contrecolorées par le vert de méthyle, montées de façon permanente, puis examinées sous un microscope (Nikon) et numérisées avec une caméra digitale (Sony).

IV.3. Analyse morphométrique

Trois sections de cartilage au niveau des condyles fémoraux et des plateaux tibiaux de chaque spécimen, dans les zones péri-lésionnelles, sont examinées sous la lumière d'un microscope (Nikon). Chaque section est scorée séparément. Ces données sont intégrées sous la forme d'une moyenne pour chaque spécimen. Le nombre de chondrocytes marqués positivement dans les zones superficielles (couche superficielle et partie supérieure de la zone intermédiaire) et profondes (partie inférieure de la zone intermédiaire et zones profondes) du cartilage est estimé comme décrit précédemment (Pelletier et coll, 1999 ; Boileau et coll, sous presse) pour la réaction de TUNEL, la caspase-3, la COX-2 et la iNOS (Figure 53).

Le nombre total de chondrocytes et le nombre de chondrocytes marqués est déterminé pour les différentes zones du cartilage. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un pourcentage de chondrocytes positifs par rapport au nombre total de chondrocytes.

VI.4. Analyse statistique

Les résultats sont donnés sous la forme de moyenne \pm sem. L'analyse statistique est faite sur les valeurs brutes et les différences sont analysées avec le test U de Mann-Withney. Les différences sont considérées significative pour une valeur de $p < 0,05$.

Résultats

I. Anabolisme des protéoglycanes du cartilage patellaire

L'injection intra-articulaire de MIA à la dose de 0,03 mg provoque une baisse critique de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage dans la partie centrale de la rotule. En revanche, elle provoque une augmentation de l'anabolisme des protéoglycanes dans la partie périphérique de la rotule (Figure 55). Cette augmentation tend à retourner vers sa valeur normale à J20. Par contre, la baisse d'anabolisme des protéoglycanes survenant au centre de la rotule persiste jusqu'à J20.

Les traitements avec le RFX, inhibiteur sélectif de COX-2 ou avec l'AINS comparateur, non sélectif, le NPX, ne provoquent pas d'effets délétères tardifs sur le cartilage patellaire. Au contraire, il est possible d'observer un effet correcteur transitoire (J10) avec le RFX à la dose de 0,75 mg/kg/j et avec le NPX à la dose de 10 mg/kg/j.

Le traitement avec le RFX à la dose de 3 mg/kg/j semble avoir un effet délétère sur l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage à J15, alors que les deux autres traitements ont un effet neutre ou très faible.

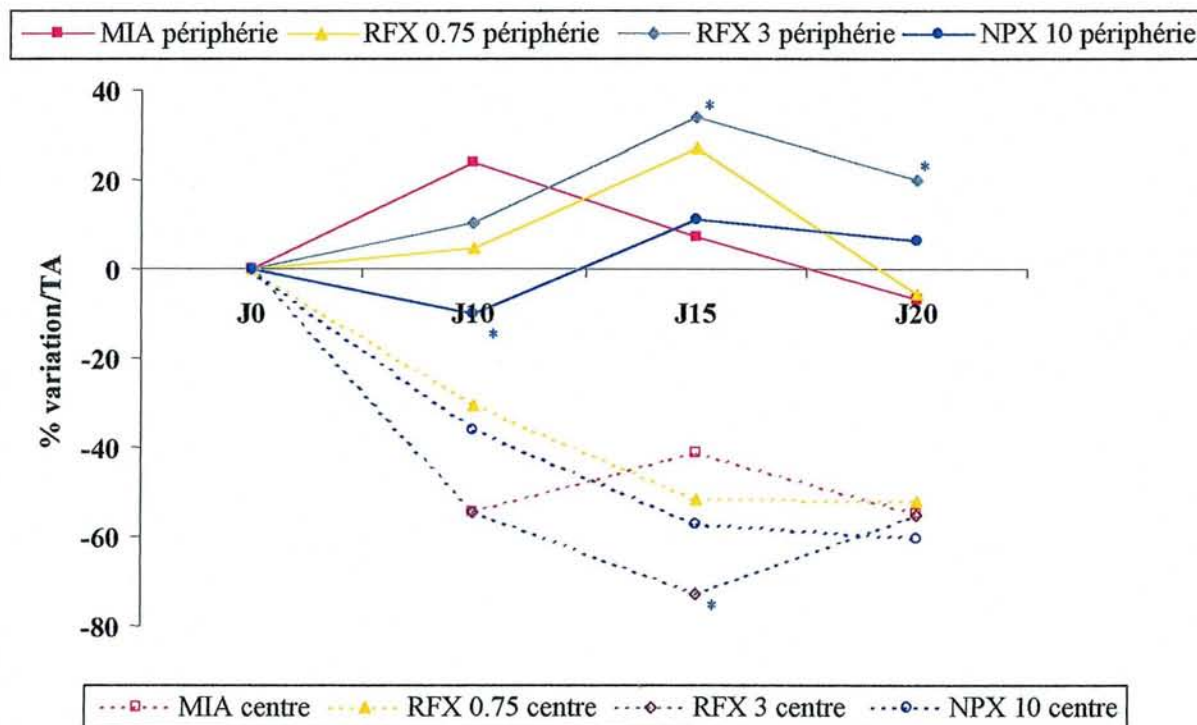


Figure 55 Variation de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage (exprimée en pourcentage de variation par rapport aux témoins absolus (TA)) dans la zone centrale et dans la zone périphérique de la rotule de rat suite à une injection intra-articulaire et bilatérale de MIA 0,03 mg et effet des traitements par le rofécoxib (RFX) aux doses de 0,75 et 3 mg/kg/j et le naproxène (NPX) à la dose de 10 mg/kg/j (n=8 rotules par groupe) (* : p<0,05)

L'étude de l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage patellaire montre que les traitements avec le RFX à la dose de 0,75 mg/kg/j et avec le NPX à la dose de 10 mg/kg/j ont des effets

équivalents et neutres sur le cartilage patellaire au cours de l'arthrose au MIA. En revanche, le RFX à la dose de 3 mg/kg/j semble être plus délétère sur ce paramètre dans nos conditions expérimentales.

II. Evaluation histologique de la sévérité de l'atteinte articulaire au cours de l'arthrose au MIA

Le score histologique de sévérité d'arthrose montre que dans le groupe MIA, l'atteinte articulaire est la plus forte à J15 (Figure 56, Planches 1 et 2).

L'atteinte se manifeste dans la majorité des cas, au niveau des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux, par l'irrégularité de la surface du cartilage pouvant aller jusqu'à l'apparition de fissure dans la zone de transition et même dans la zone radiale (Figure 53), une hypocellularité accompagnée de l'apparition de clusters. La décoloration au bleu de toluidine est globalement modérée à sévère. La couche de chondrocytes hypertrophiques n'est que rarement réduite totalement. De même, nous n'avons observé que de rares cas d'ostéolyse, notamment dans des zones de gonflement du cartilage. Cependant, les remaniements osseux sont fréquents chez les animaux MIA.

Globalement, les traitements semblent sans effet significatif sur le score global de sévérité d'arthrose. Seul le naproxène à J20 provoque une augmentation significative du score.

Ces résultats sont globalement cohérents avec ce qui l'on a pu observer avec l'anabolisme des protéoglycanes au niveau du cartilage rotulien, même si l'atteinte ne semble pas se manifester exactement au même moment dans les différents compartiments de l'articulation (au niveau de la rotule et des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux).

Losque l'on considère la part de chaque critère d'évaluation dans le score global (Figure 57), on constate que globalement, les traitements sont sans effet, quel que soit le paramètre considéré et quel que soit le temps, c'est-à-dire qu'ils ne modifient pas l'incidence de ce paramètre dans le score global. Seul un effet transitoire précoce, se traduisant par une hypercellularité, est observé à J10 avec le NPX. Cet effet semble s'estomper avec le temps.

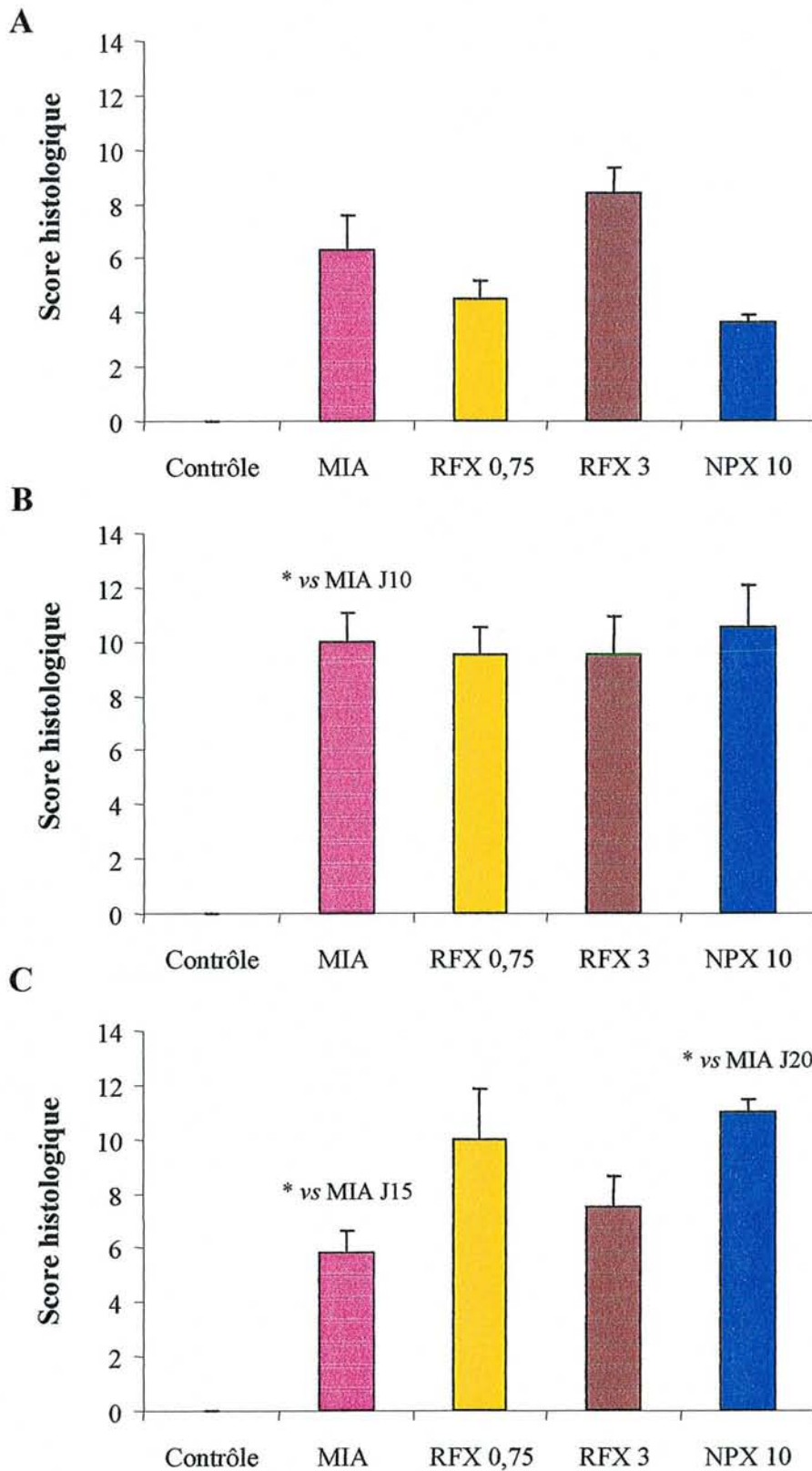


Figure 56 Score histologique de sévérité d'arthrose évalué sur des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux (n=8 par groupe) de rats injectés ou non avec du MIA à la dose de 0,03 mg et traités ou non avec du RFX aux doses de 0,75 et 3 mg/kg/j ou avec du NPX à la dose de 10 mg/kg/j, 10 jours (A), 15 jours (B) ou 20 jours (C) après l'injection (* : p<0,05).

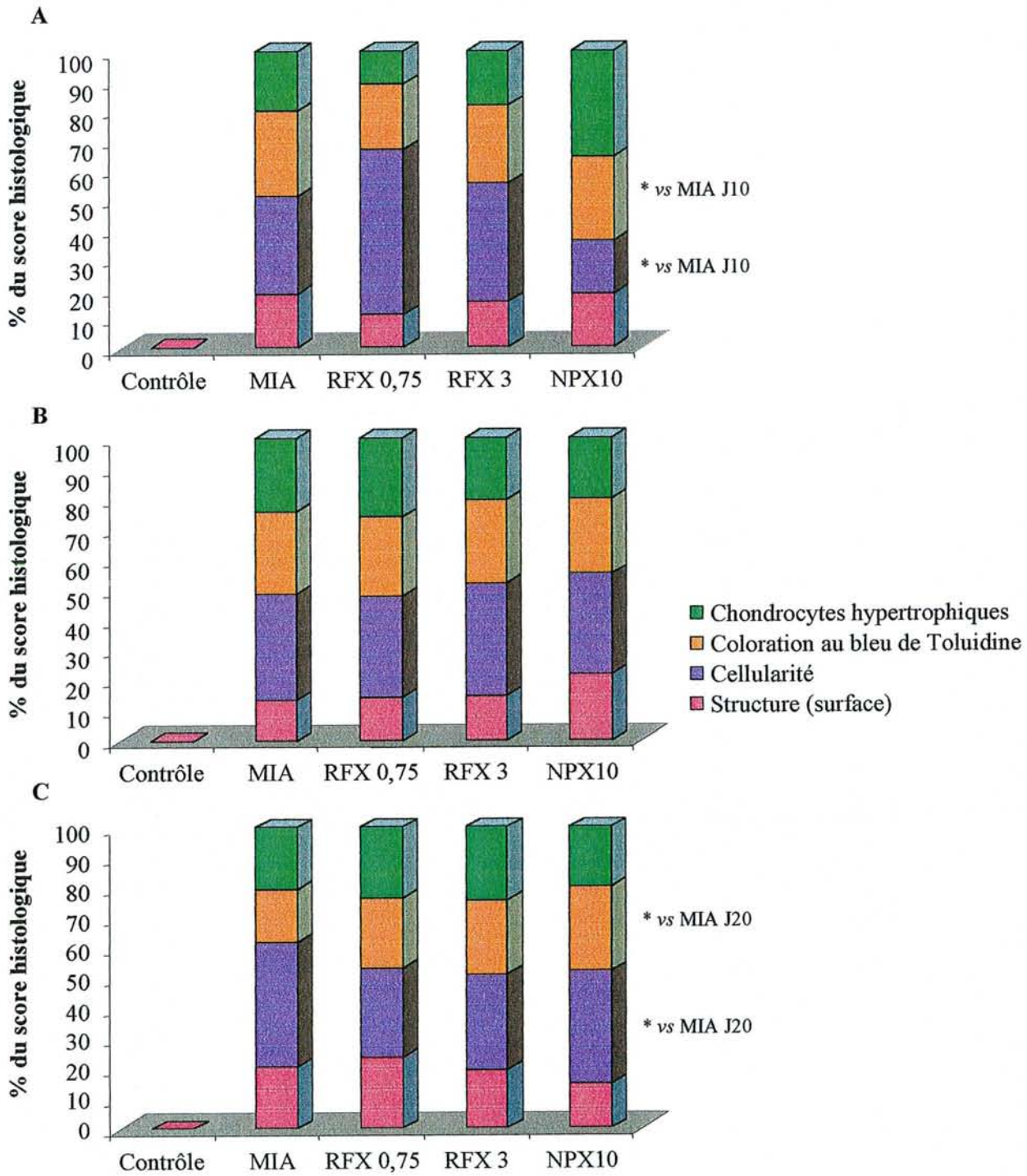
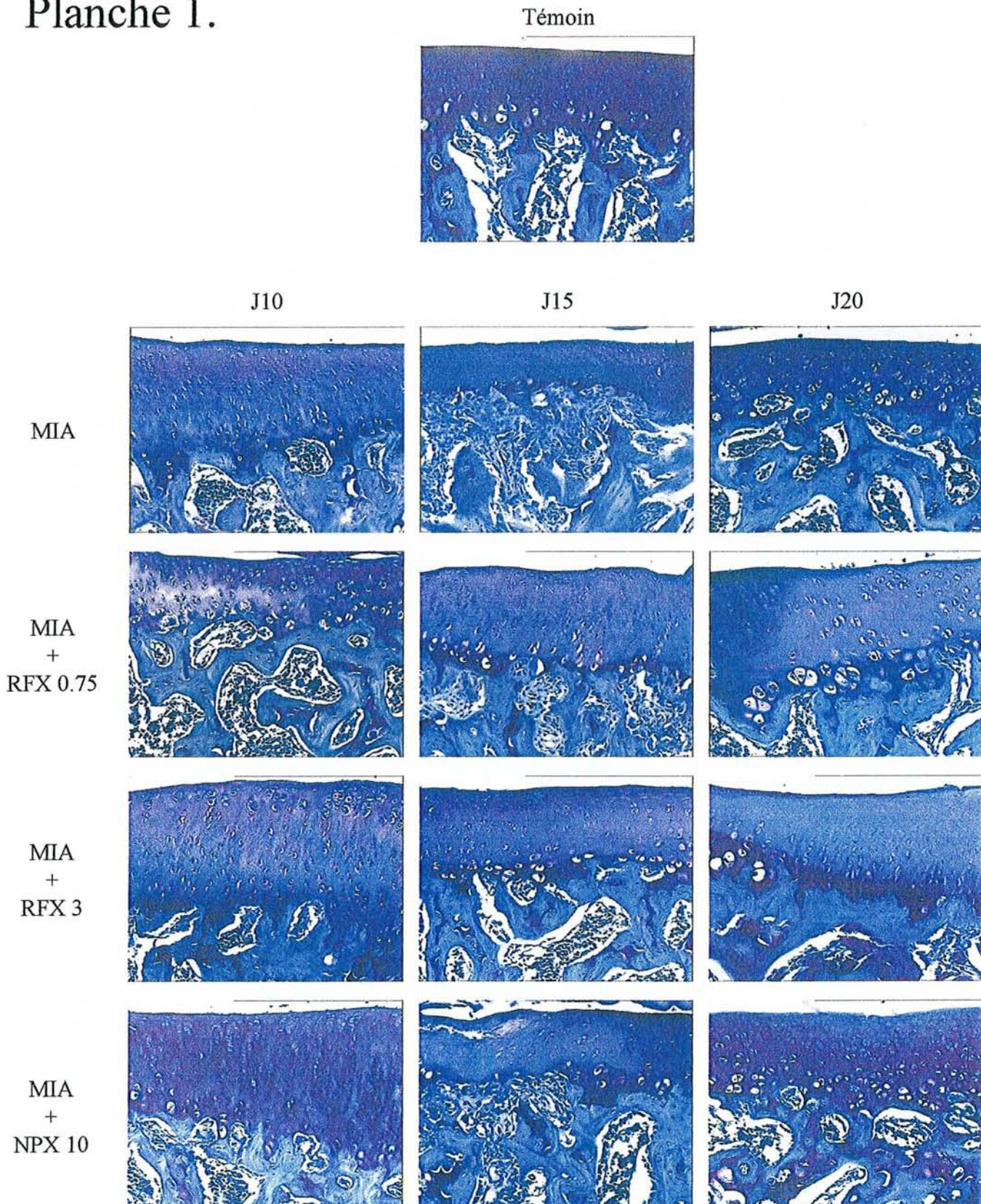


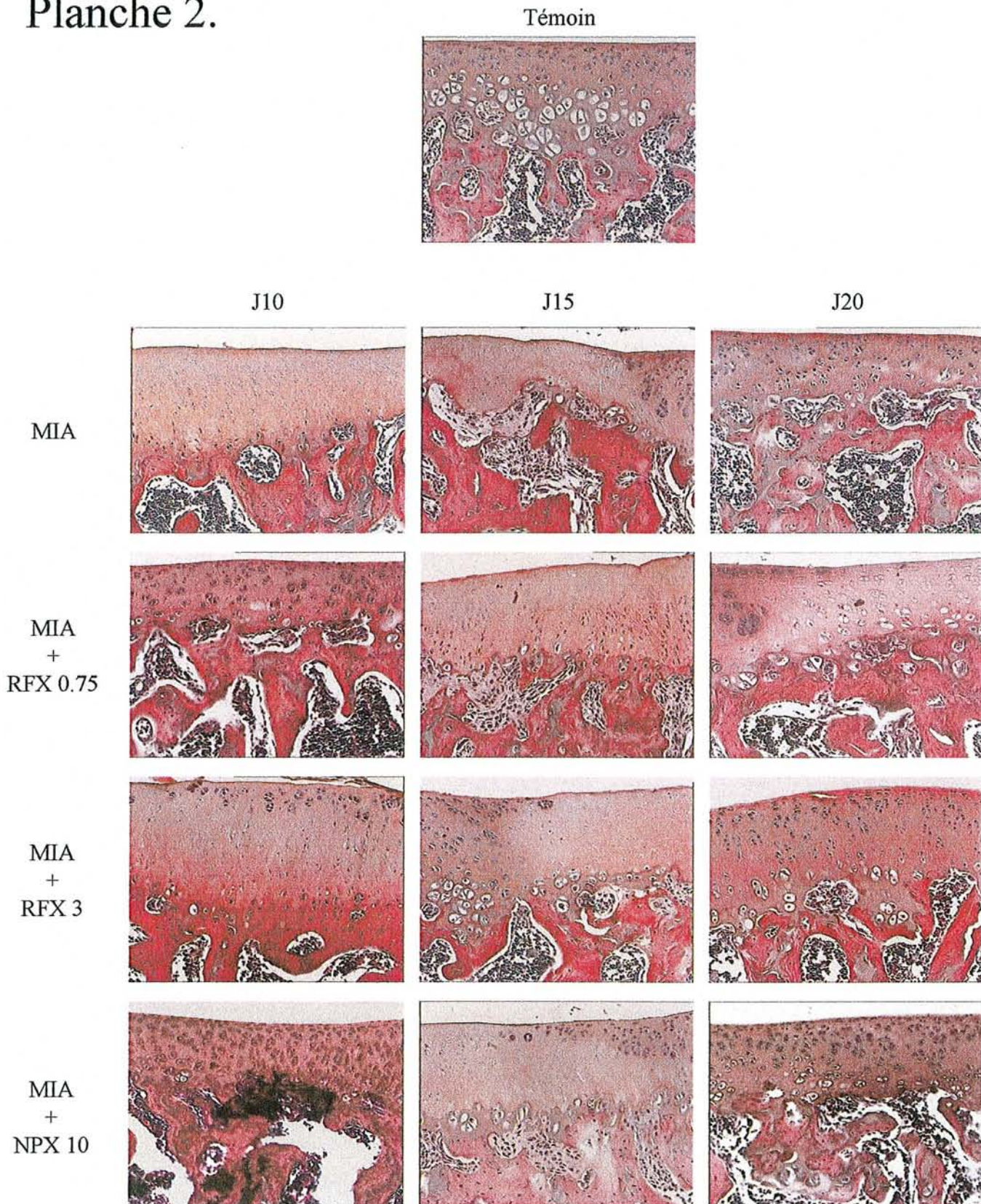
Figure 57 Décomposition du score histologique de sévérité d'arthrose

Planche 1.



Coloration histologique au bleu de toluidine sur des coupes sagittales d'articulations de rat (plateaux tibiaux), injectés ou non avec du MIA 0,03 mg, et effet des traitements de 10, 15 ou 20 jours par du rofécoxib (RFX) aux doses de 0,75 et 3 mg/kg/j ou par du naproxène (NPX) à la dose de 10 mg/kg/j (grossissement total X100)

Planche 2.



Coloration histologique HES (hématoxylline, eosine, safran) sur des coupes sagittales d'articulations de rat (plateaux tibiaux), injectés ou non avec du MIA 0,03 mg, et effet des traitements de 10, 15 ou 20 jours par du rofécoxib (RFX) aux doses de 0,75 et 3 mg/kg/j ou par du naproxène (NPX) à la dose de 10 mg/kg/j (grossissement total X100)

III. Immunodétection de la mort cellulaire au cours de l'arthrose au MIA

La réaction de Tunel permet de détecter la fragmentation internucléosomale survenant au cours du processus apoptotique. La quantification du marquage par l'analyse morphométrique des coupes histologiques montre que le nombre de chondrocytes marquées positivement par la réaction de Tunel est largement augmenté dans le cartilage arthrosique lors de l'arthrose au MIA (Tableau 27, Planche 3). Cette augmentation est visible dès J10 et est conservée jusqu'à J20. Il semble cependant exister une différence entre les couches superficielles et profondes du cartilage. En effet, le pourcentage de cellules positives est légèrement plus important en surface.

Les traitements ne semblent pas affecter le pourcentage des cellules positives pour la réaction de Tunel, à l'exception du RFX à la dose de 3 mg/kg/j à J15 dans les couches profondes. Cet effet aggravant est lié à un appauvrissement cellulaire marqué.

Tableau 27 Pourcentage de mort cellulaire détectée dans les chondrocytes (Tunel, In Situ Cell Death Detection kit, Roche), dans le cartilage articulaire de rat arthrosique (MIA) ou non, traité ou non par AINS

	% chondrocytes positifs (TUNEL)					
	J10		J15		J20	
	Superficie	Profondeur	Superficie	Profondeur	Superficie	Profondeur
Contrôle	-----	-----	16,4±2,2	22,5±1,6	-----	-----
MIA						
0,03 mg	29,8±3,6*	26,3±1,5	28,7±2,2*	28,6±2,4*	26,7±2,8*	20,0±3,4
RFX						
0,75 mg/kg/j	21,7±2,6	25,9±3,3	39,3±6,0*	30,8±4,5*	24,4±0,8*	19,2±2,8
RFX						
3 mg/kg/j	25,9±2,8*	21,4±2,6	28,6±11,1*	10,0±1,7 [#]	27,7±1,3*	21,5±0,3
NPX						
10 mg/kg/j	23,7±5,2	24,9±0,9	23,0±1,9*	18,2±2,0 [#]	20,2±2,8	21,3±5,2

(n=4 plateaux et 4 condyles par groupe ; * : p<0,05/control, [#] : p<0,05/MIA)

IV. Immunodétection d'un effecteur de l'apoptose dans le cartilage

articulaire : la caspase-3 active

La caspase-3 sous sa forme active est un effecteur de l'apoptose. La détection de cette protéine est un indicateur de la mort cellulaire par apoptose.

La quantification de l'expression de la caspase-3 active montre que celle-ci est largement augmentée dans le cartilage articulaire arthrosique (Tableau 28, Planche 4), aussi bien dans les zones superficielles que dans les zones profondes.

Les traitements ne semblent pas potentialiser l'expression de la forme active de la caspase-3, au niveau des plateaux et des condyles fémoraux, dans les zones superficielles et profondes du cartilage et semblent même la diminuer légèrement mais de façon non significative..

Tableau 28 Pourcentage de chondrocytes positifs pour la caspase-3 active, détectée par immunohistochimie, dans le cartilage articulaire de rat arthrosique (MIA) ou non, traité ou non par AINS

	% chondrocytes positifs					
	J10		J15		J20	
	Superficie	Profondeur	Superficie	Profondeur	Superficie	Profondeur
Contrôle			14,8±2,0	9,1±1,5		
MIA 0,03 mg	25,5±2,8*	16,7±3,0*	25,4±2,4*	11,7±5,1	21,4±1,0*	10,1±2,5
RFX 0,75 mg/kg/j	24,9±1,8*	24,3±3,6*	18,6±1,6	12,0±2,0	19,0±1,7	10,1±1,8
RFX 3 mg/kg/j	21,9±3,1	17,4±5,0	22,3±3,7	9,1±3,7	18,6±1,0	8,6±1,7
NPX 10 mg/kg/j	19,4±1,5	15,1±0,7*	15,3±1,0 [#]	7,2±2,4	20,6±3,2	7,3±1,5

(n=4 plateaux et 4 condyles; * : p<0,05/control, [#] : p<0,05/MIA)

La quantification de la mort chondrocytaire par apoptose, par la technique de Tunel et par l'immunodétection de la forme active de la caspase-3 ont donc montré que globalement les traitements avec le RFX et le NPX sont sans effet délétère sur la composante apoptotique. Cependant, il semble exister une discordance entre le pourcentage de cellules marquées positivement par la réaction du Tunel et celui pour la caspase-3 active.

V. Immunodétection des médiateurs potentiels de l'apoptose

V.1. iNOS

Tableau 29 Pourcentage de chondrocytes positifs pour la iNOS, détectée par immunohistochimie, dans le cartilage articulaire de rat arthrosique (MIA) ou non, traité ou non par AINS

	% chondrocytes positifs					
	J10		J15		J20	
	Superficie	Profondeur	Superficie	Profondeur	Superficie	Profondeur
Contrôle			14,0±1,4	12,7±1,7		
MIA 0,03 mg	24,4±2,4*	21,0±1,8*	28,0±3,0*	20,0±3,6	14,0±1,2	15,1±3,0
RFX 0,75 mg/kg/j	27,5±1,7*	14,6±1,4 [#]	22,0±2,1*	16,0±1,6	17,3±3,3	13,0±4,0
RFX 3 mg/kg/j	25,7±3,2*	11,8±2,0 [#]	17,9±2,1 [#]	14,1±0,9	17,2±1,6	16,0±2,6
NPX 10 mg/kg/j	22,7±2,4*	16,0±2,0	21,7±1,9*	13,1±2,0	14,3±1,9	12,1±0,8

(n=4 plateaux et 4 condyles; * : p<0,05/control, [#] : p<0,05/MIA)

L'expression de la iNOS dans les chondrocytes est largement augmentée au cours de l'arthrose au MIA au niveau des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux (Tableau 29, Planche 5). Cette augmentation est nettement marquée à J10 et J15. Par contre, elle retrouve

un niveau basal à J20. Cette augmentation est plus marquée dans les zones superficielles que dans les zones profondes du cartilage.

Les traitements sont sans effet significatif sur l'expression de iNOS.

V.2. COX-2

L'expression de COX-2 est augmentée de façon significative dans le cartilage des rats MIA non traités. Cette augmentation est plus marquée dans les zones superficielles que dans les zones profondes du cartilage articulaire (Tableau 30, Planche 6).

L'expression de COX-2 est maximale à J10 puis diminue progressivement jusqu'à J20 pour retrouver son niveau basal d'expression.

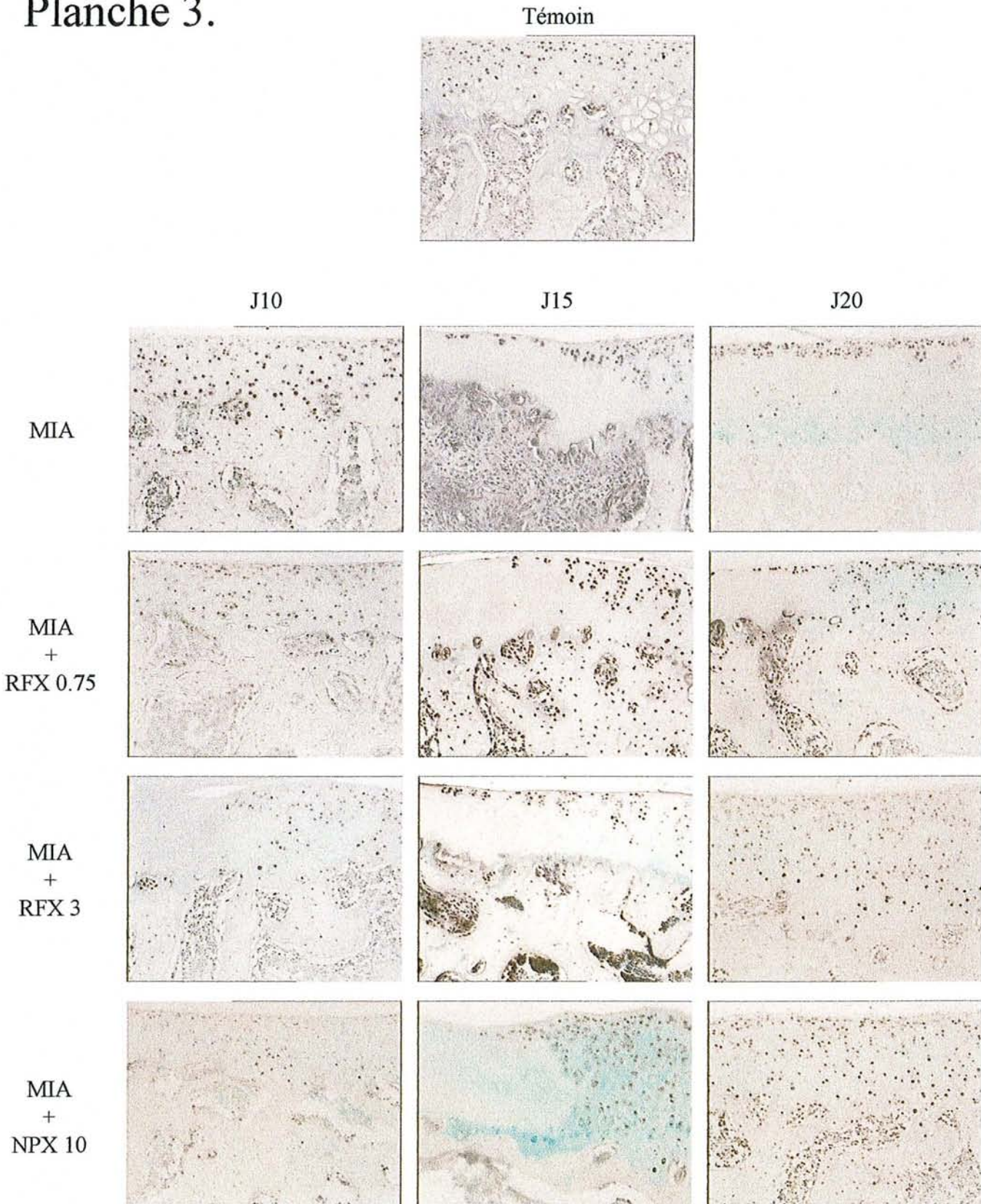
Les traitements diminuent l'expression de COX-2, de façon plus marquée dans les zones profondes que dans les zones superficielles du cartilage.

Tableau 30 Pourcentage de chondrocytes positifs pour COX-2, détectée par immunohistochimie, dans le cartilage articulaire de rat arthrosique (MIA) ou non, traité ou non par AINS

	% chondrocytes positifs					
	J10		J15		J20	
	<i>Superficie</i>	<i>Profondeur</i>	<i>Superficie</i>	<i>Profondeur</i>	<i>Superficie</i>	<i>Profondeur</i>
Contrôle	-----	-----	18,3±1,4	10,0±1,1	-----	-----
MIA 0,03 mg	30,9±2,9*	15,6±1,5	22,3±0,8	12,9±1,1	16,2±1,8	11,0±1,5
RFX 0,75 mg/kg/j	20,7±1,5	11,4±0,7	23,2±2,1	11,4±1,5	18,9±0,9	6,5±1,3
RFX 3 mg/kg/j	20,2±2,3 [#]	9,68±1,9 [#]	16,7±2,6	8,8±1,1 [#]	20,8±7,4	12,8±3,6
NPX 10 mg/kg/j	20,3±1,4 [#]	12,0±1,7	19,3±2,1	9,1±1,4	33,3±3,7* [#]	11,6±3,0

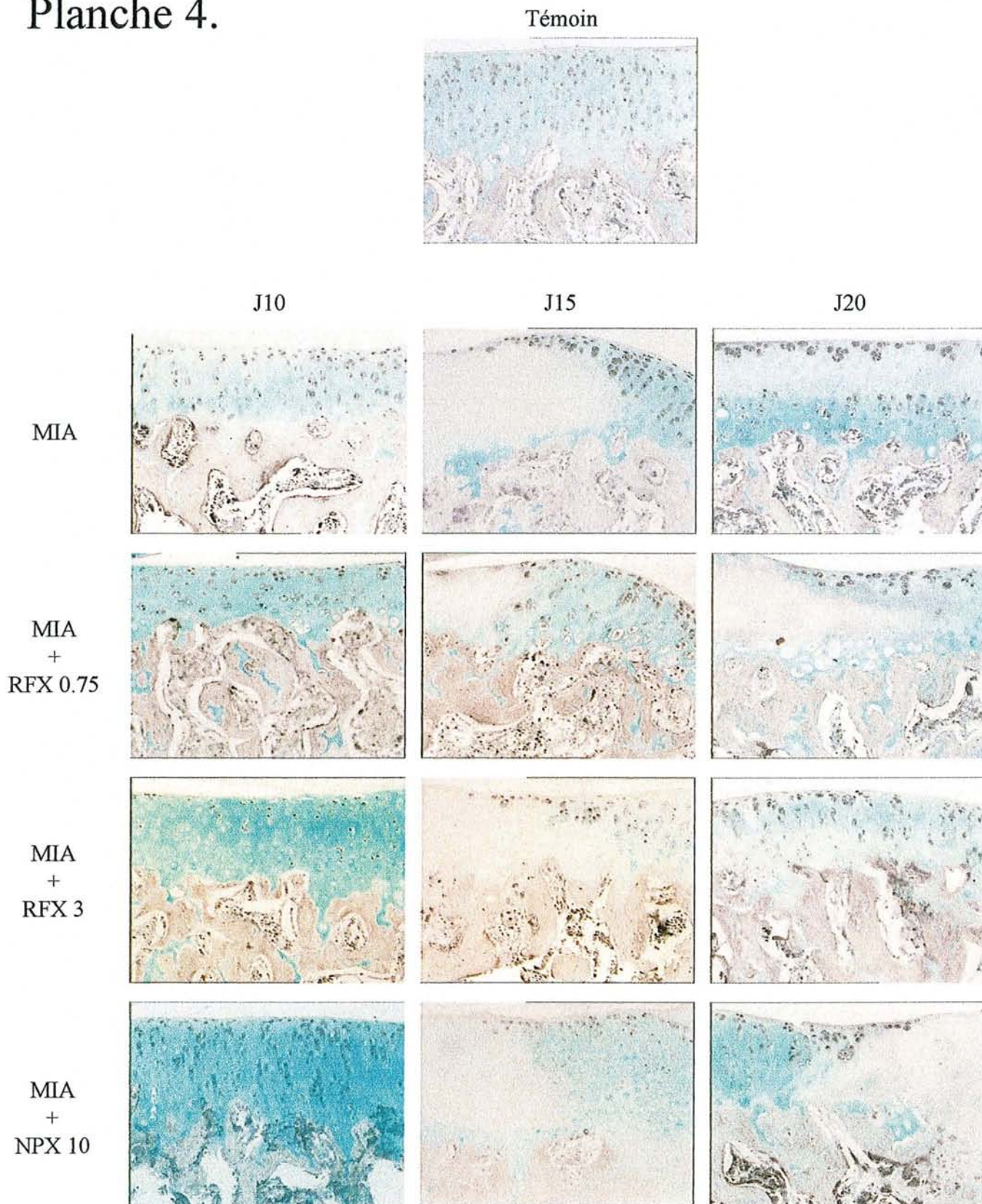
(n=4 plateaux et 4 condyles; * : p<0,05/control, [#] : p<0,05/MIA)

Planche 3.



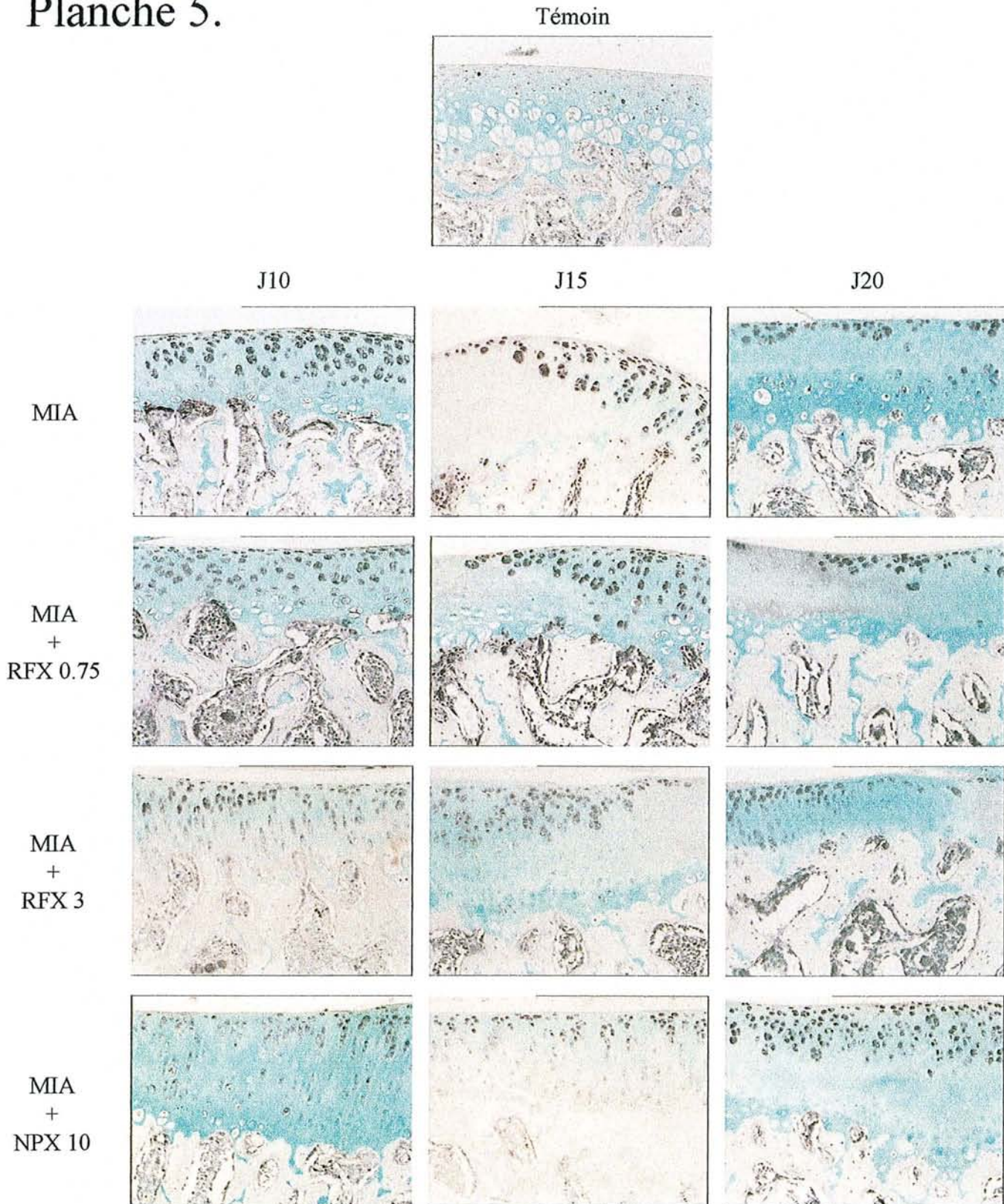
Sections représentatives de cartilage montrant la détection de la mort cellulaire dans les chondrocytes par la réaction de Tunel sur des coupes sagittales d'articulations de rat (plateaux tibiaux), injectés ou non avec du MIA 0,03 mg, et effet des traitements de 10, 15 ou 20 jours par du rofécoxib (RFX) aux doses de 0,75 et 3 mg/kg/j ou par du naproxène (NPX) à la dose de 10 mg/kg/j (grossissement total X100)

Planche 4.



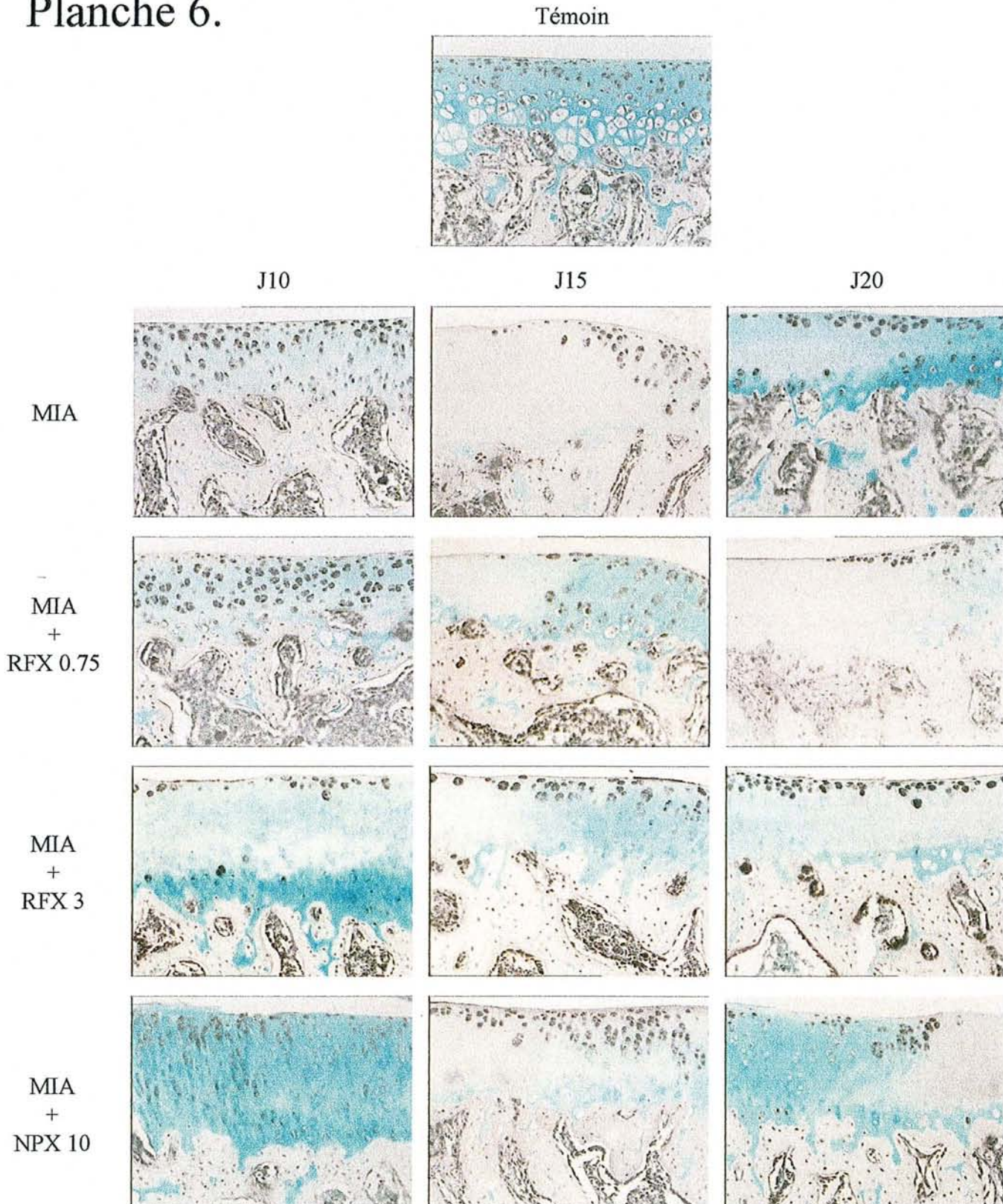
Sections représentatives de cartilage montrant la détection de la caspase-3 active par immunohistochimie dans les chondrocytes sur des coupes sagittales d'articulations de rat (plateaux tibiaux), injectés ou non avec du MIA 0,03 mg, et effet des traitements de 10, 15 ou 20 jours par du rofécoxib (RFX) aux doses de 0,75 et 3 mg/kg/j ou par du naproxène (NPX) à la dose de 10 mg/kg/j (grossissement total X100)

Planche 5.



Sections représentatives de cartilage montrant la détection de la iNOS par immunohistochimie dans les chondrocytes sur des coupes sagittales d'articulations de rat (plateaux tibiaux), injectés ou non avec du MIA 0,03 mg, et effet des traitements de 10, 15 ou 20 jours par du rofécoxib (RFX) aux doses de 0,75 et 3 mg/kg/j ou par du naproxène (NPX) à la dose de 10 mg/kg/j (grossissement total X100)

Planche 6.



Sections représentatives de cartilage montrant la détection de COX-2 par immunohistochimie dans les chondrocytes sur des coupes sagittales d'articulations de rat (plateaux tibiaux), injectés ou non avec du MIA 0,03 mg, et effet des traitements de 10, 15 ou 20 jours par du rofécoxib (RFX) aux doses de 0,75 et 3 mg/kg/j ou par du naproxène (NPX) à la dose de 10 mg/kg/j (grossissement total X100)

***Etude expérimentale
4^{ème} partie***

***Effet d'un inhibiteur mixte COX/5-LOX,
ML-3000, sur l'apoptose chondrocytaire
dans l'arthrose expérimentale
par LCA chez le chien***

MATERIEL ET METHODE

I. Animaux et traitements

I.1. Animaux

L'étude a été réalisée sur des chiens croisés adultes (n=22), âgés de 2 à 3 ans, pesant 25 à 30 kg. Les animaux sont hébergés dans une ferme d'élevage, avec un libre accès à l'exercice.

I.2. Induction de l'arthrose

L'arthrose est induite comme décrite précédemment par Pelletier et coll, 1999, par la section chirurgicale du ligament croisé antérieur droit. Les animaux sont anesthésiés par une injection intraveineuse de pentobarbital (25 mg/kg) et intubés. La section du ligament croisé antérieur est pratiquée chirurgicalement en conditions stériles.

I.3. Traitements

Les animaux sont répartis en 3 groupes : **Groupe 1-** animaux ayant subi la section du ligament croisé antérieur droit et recevant un traitement placebo ; **Groupe 2-** animaux ayant subi la section du ligament croisé antérieur droit et traité oralement par 2,5 mg/kg/j de ML-3000 (Merckle GmbH, Ulm, Allemagne) ; **Groupe 3-** animaux ayant subi la section du ligament croisé antérieur droit et traité oralement par 5 mg/kg/j de ML-3000.

Le traitement est administré de façon biquotidienne, sous la forme de comprimé et commence immédiatement après l'opération. Les animaux sont sacrifiés après 8 semaines de traitement. Le groupe contrôle reçoit un placebo sous la forme de carboxyméthylcellulose encapsulée.

II. Etude de l'effet de l'inhibition mixte COX/5-LOX sur l'apoptose chondrocytaire

II.1. Préparation des spécimens

Les études immunohistochimiques sont réalisées sur des échantillons de cartilage prélevés au niveau des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux d'animaux arthrosiques, ayant ou non reçu un traitement. Les échantillons sont prélevés en bordure des lésions dans les groupes arthrosiques.

Les spécimens sont tout d'abord fixés dans TissuFix#2 (Laboratoires Gilles Chaput, Montréal, Québec, Canada) pour 24 heures avant d'être déshydratés et inclus dans la paraffine. Les coupes de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica) et placées sur des lames Superfrost Plus (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada).

II.2. Détection de l'apoptose *in situ*

La détection de la fragmentation de l'ADN est réalisée comme décrit précédemment (Pelletier et coll, 1999) avec le kit Apoptag de détection de l'apoptose *in situ* (Intergen, Purchase, NY). Brièvement, les coupes sont digérées pendant 45 minutes à 37°C par 0,25 unité/ml de chondroïtinase ABC pH 8,0 (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canada) dans du PBS pH 7,4, puis perméabilisées dans un bain à 0,3% de Triton X100 (Sigma-Aldrich, Canada) pendant 20 minutes à température ambiante. Elles sont enfin digérées pendant 15 minutes à 37°C par de la protéinase K (20 µg/ml ; Sigma-Aldrich, Canada). Les lames sont lavées entre chaque étape dans du PBS pH 7,4 à trois reprises. Les extrémités 3' de l'ADN générées par la fragmentation génomique sont détectées grâce à des dUTP couplés à la digoxigénine, ajoutés aux extrémités de l'ADN par une terminale deoxynucleotidyltransférase (TdT). Ces nucléotides sont ensuite reconnus par un conjugué couplé à la peroxydase. Le marquage est révélé grâce à un substrat de la peroxydase (DAB, Intergen) (Figure 58). Les coupes sont contrecolorées à l'éosine et montées de façon permanente avec du permount (Fisher Scientific, Canada).

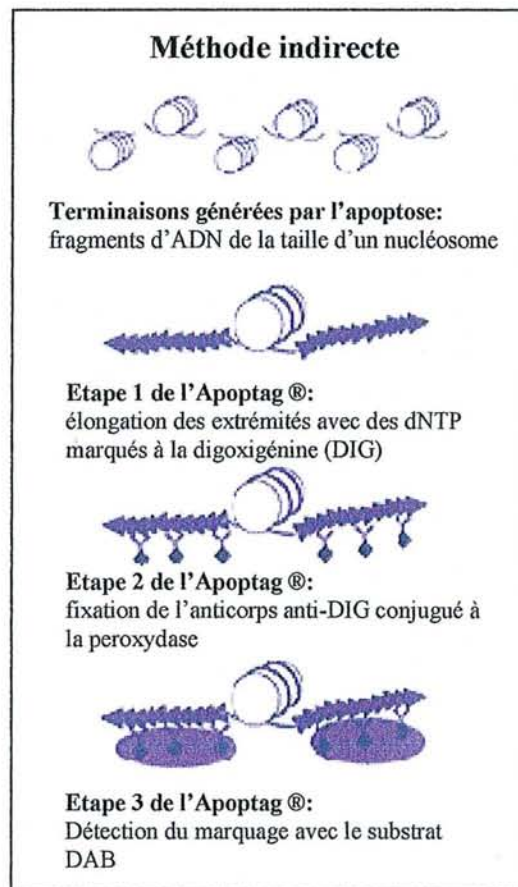


Figure 58 Représentation schématique de la détection *in situ* de la mort cellulaire avec le kit Apoptag ® (Intergen)

III. Etudes immunohistochimiques

Les spécimens sont fixés, deshydratés et inclus dans la paraffine comme décrit plus haut et les coupes sont traitées comme décrit précédemment (Moldovan et coll, 1997 ; Pelletier et coll, 1993). Elles sont déparaffinées dans le toluène et réhydratées dans des bains d'alcool de titre décroissant. Elles sont ensuite perméabilisées par une digestion de 90 minutes à 37°C par 0,25 unités/ml de chondroïtinase ABC pH 8,0 (Sigma-Aldrich, Canada), puis incubées pendant 30 minutes dans une solution à 3% de Triton X100 dans du PBS pH 7,4. Comme précédemment, les lames sont incubées dans une solution à 0,3% de peroxyde d'hydrogène pendant 10 minutes à température ambiante. Les spécimens sont incubés pendant 18 heures à 4°C avec les différents anticorps : i) anticorps polyclonal de lapin (IgG) anti-caspase-3 (5 µg/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) reconnaissant uniquement la forme active (sous-unité p20) ; ii) anticorps polyclonal de lapin (IgG) anti-rhCOX-2 (dilution 1/250, Oxford Biochemical Research Inc., Oxford, MI) ; iii) anticorps polyclonal de lapin (IgG) anti-NOS 2 (1 µg/ml ; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). Les spécimens ont été bloqués au préalable avec une solution universelle de blocage (Dako Diagnostics Canada Inc., Mississauga, Ontario, Canada) pendant 30 minutes à température ambiante. Les lames sont marquées en utilisant la méthode du complexe avidine-biotine (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Cette méthode consiste à incuber les spécimens avec un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé pour 45 minutes à température ambiante puis avec un complexe avidine-biotine-peroxydase pour 45 minutes à température ambiante. Toutes les incubations sont faites dans une chambre humide. La coloration est développée avec un substrat chromogène DAB (Dako Diagnostics Canada Inc.).

Tous les anticorps ont été testés préalablement pour leur spécificité envers les formes canines de caspase-3, COX-2 et iNOS (Pelletier et coll, 2000 ; Pelletier et coll, 1999).

La spécificité du marquage a été confirmée par différents contrôles : i) immunoabsorbé (incubation de l'anticorps pendant 1 heure à 37°C avec le peptide correspondant ou la protéine recombinante 10 à 20 fois en excès) ; ii) omission du premier anticorps ; iii) substitution du premier anticorps par un sérum pré-immun autologue.

Les coupes sont examinées au microscope (Leitz Orthoplan, Ville St-Laurent, Québec, Canada) et photographiées en utilisant des films Kodak Ektachrome 64 ASA (Rochester, NY) à un grossissement total de 100.

IV. Analyse morphométrique

Trois sections de chaque condyle fémoral et plateau tibial de chaque spécimen sont examinées sous la lumière du microscope. Chaque section est scorée séparément. Ces données sont intégrées sous la forme d'une moyenne pour chaque spécimen. Le nombre de chondrocytes marqués positivement dans les zones superficielles (couche superficielle et partie supérieure de la zone intermédiaire) du cartilage est estimé comme décrit précédemment (Moldovan et coll, 1997 ; Pelletier et coll, 1999) pour la réaction de TUNEL, la caspase-3, la COX-2 et la iNOS.

Le nombre total de chondrocytes et le nombre de chondrocytes marqués est déterminé pour les différentes zones du cartilage. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un pourcentage de chondrocytes positifs par rapport au nombre total de chondrocytes.

Les résultats sont donnés sous la forme d'une moyenne \pm sem.

V. Analyse statistique

Les résultats sont donnés sous la forme de moyenne \pm sem. L'analyse statistique est faite sur les valeurs brutes et les différences sont analysées avec le test U de Mann-Withney. Les différences sont considérées significative pour une valeur de $p < 0,05$.

RESULTATS

I. Apoptose chondrocytaire

Une large proportion des chondrocytes réagissent positivement à la réaction de Tunel dans les zones superficielles du cartilage des chiens du groupe OA-placebo (Tableau 31, Planche 7). Des études précédentes avaient mis en évidence que les cellules positives dans le cartilage OA lors de la réaction de Tunel étaient significativement plus nombreuses que dans le cartilage normal (Pelletier et coll, 1998). Le traitement avec le ML-3000 à des doses thérapeutiques réduit de façon significative, non seulement le score macroscopique de sévérité d'arthrose (Jovanovic et coll, 2001), mais aussi le nombre de chondrocytes positifs dans le cartilage articulaire. La réduction ne semble pas être dépendante de la dose.

Tableau 31 Pourcentage de mort cellulaire détectée dans les chondrocytes (ApopTag, Intergen), dans le cartilage articulaire arthrosique de chien, traité ou non avec le ML-3000 2,5 ou 5 mg/kg/j

Groupe	Nombre d'animaux	% de cellules positives	
		Condyles Fémoraux	Plateaux Tibiaux
OA (placebo)	7	30,8±1,9	31,0±2,4
ML-3000 2,5 mg/kg/j	7	9,6±1,9 * <i>p</i> <0,0001	12,0±1,7 * <i>p</i> <0,0001
ML-3000 5 mg/kg/j	7	11,5±1,9 * <i>p</i> <0,0001	14,0±1,8 * <i>p</i> <0,0002

* : les valeurs de p sont données par rapport au groupe OA (placebo)

II. Détection d'un effecteur de l'apoptose par immunohistochimie : la caspase-3 active

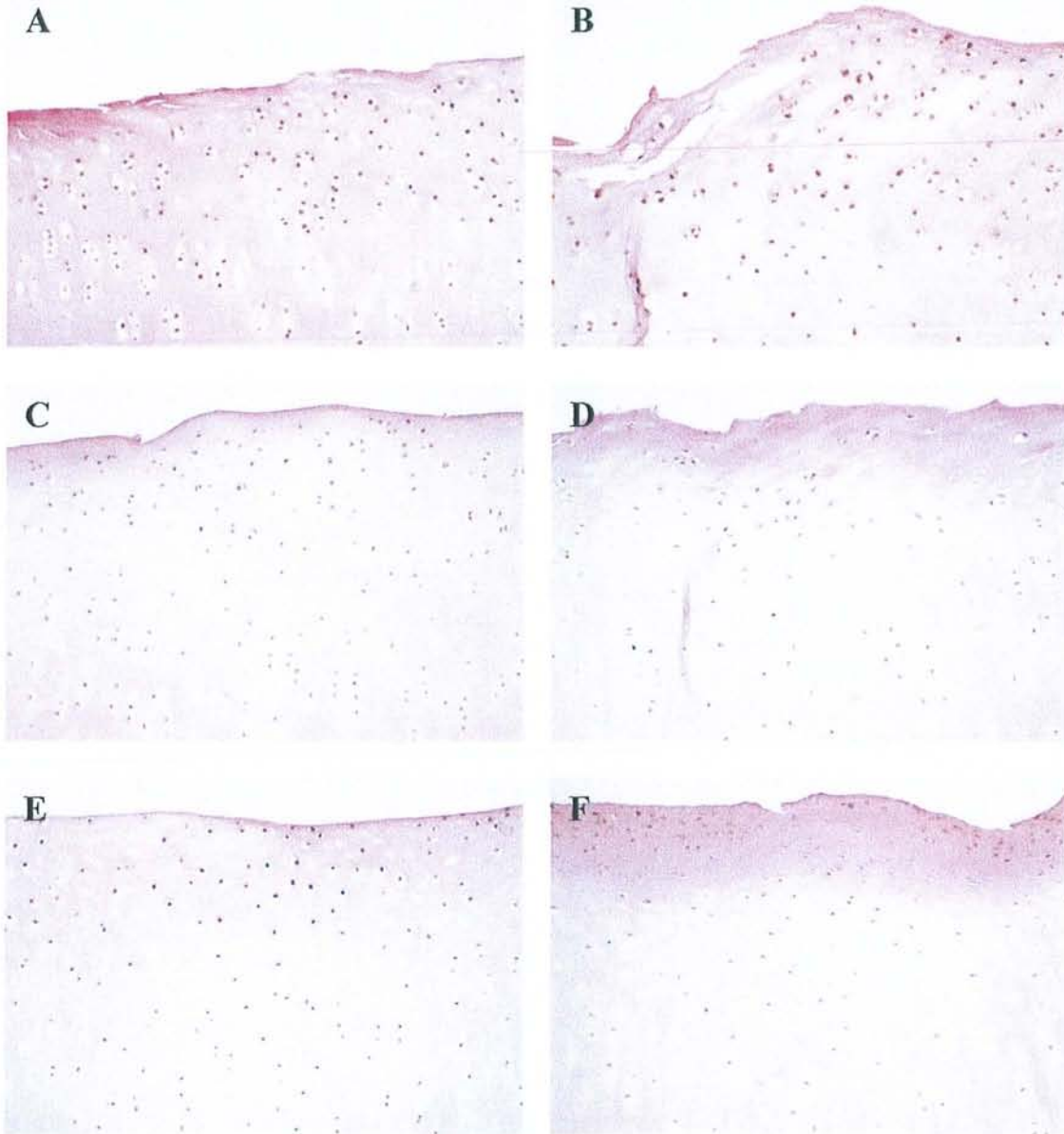
Tableau 32 Pourcentage d'expression de la caspase-3, détecté dans les chondrocytes, dans le cartilage articulaire arthrosique de chien, traité ou non avec le ML-3000 2,5 ou 5 mg/kg/j

Groupe	Nombre d'animaux	% de cellules positives	
		Condyles Fémoraux	Plateaux Tibiaux
OA (placebo)	7	30,5±2,7	29,6±3,4
ML-3000 2,5 mg/kg/j	7	6,6±1,5 * <i>p</i> <0,0001	5,4±1,1 * <i>p</i> <0,0001
ML-3000 5 mg/kg/j	7	3,7±1,1 * <i>p</i> <0,0001	2,5±0,6 * <i>p</i> <0,0001
		# <i>p</i> <0,05	# <i>p</i> <0,04

* : les valeurs de p sont données par rapport au groupe OA (placebo)

: les valeurs de p sont déterminées par rapport au groupe ML-3000 2,5 mg/kg/j

Planche 7.



Sections représentatives de cartilage montrant la détection de la mort cellulaire dans les chondrocytes par la réaction de Tunel dans les condyles fémoraux (gauche) et les plateaux tibiaux (droite), de chiens OA (placebo) (A et B) et de chiens traités par du ML-3000 2,5 mg/kg/j (C et D) et 5 mg/kg/j (E et F) (grossissement X100)

Environ 30% des chondrocytes des couches superficielles du cartilage arthrosique sont positifs pour la caspase-3 active (Tableau 32, Planche 8). Chez les chiens traités, le nombre de chondrocytes marqués positivement pour la caspase-3 active est réduit de façon significative. Comme pour les résultats obtenus avec le Tunel, les deux doses de ML-3000 testées dans cette étude provoquent la même inhibition de l'expression de la caspase-3.

III. Détection des médiateurs potentiels de l'apoptose par immunohistochimie

III.1. iNOS

Une large proportion de chondrocytes sont positifs pour la iNOS dans le cartilage OA de chien (Tableau 33, Planche 9). Les spécimens des groupes traités par le ML-3000 montrent une réduction significative du marquage pour la iNOS. Comme nous l'avons mentionné précédemment, il n'y a pas de dose-dépendance dans l'inhibition de l'expression de l'enzyme.

Tableau 33 Pourcentage d'expression de la iNOS, détecté dans les chondrocytes, dans le cartilage articulaire arthrosique de chien, traité ou non avec le ML-3000 2,5 ou 5 mg/kg/j

Groupe	Nombre d'animaux	% de cellules positives	
		Condyles Fémoraux	Plateaux Tibiaux
OA (placebo)	7	24,8±2,9	29,4±2,3
ML-3000 2,5 mg/kg/j	7	12,1±0,9 * <i>p</i> <0,002	11,1±1,4 * <i>p</i> <0,001
ML-3000 5 mg/kg/j	7	10,7±1,7 * <i>p</i> <0,002	11,1±1,0 * <i>p</i> <0,001

* : les valeurs de p sont données par rapport au groupe OA (placebo)

III.2. COX-2

Tableau 34 Pourcentage d'expression de COX-2, détecté dans les chondrocytes, dans le cartilage articulaire arthrosique de chien, traité ou non avec le ML-3000 2,5 ou 5 mg/kg/j

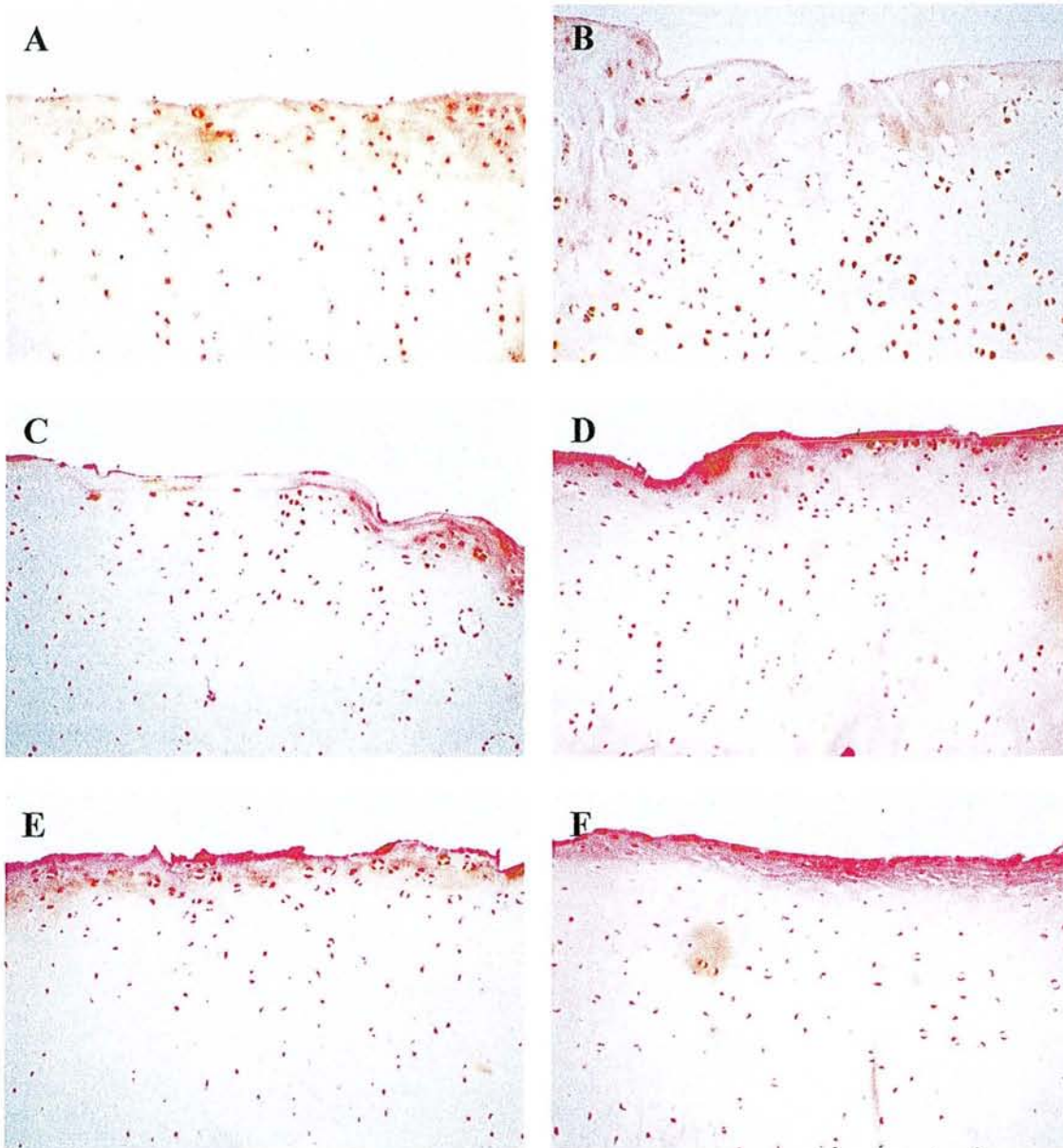
Groupe	Nombre d'animaux	% de cellules positives	
		Condyles Fémoraux	Plateaux Tibiaux
OA (placebo)	7	31,7±1,4	30,1±2,0
ML-3000 2,5 mg/kg/j	7	15,9±1,0 * <i>p</i> <0,001	16,6±1,2 * <i>p</i> <0,001
ML-3000 5 mg/kg/j	7	10,8±1,1 * <i>p</i> <0,002	10,4±1,3 * <i>p</i> <0,001
		# <i>p</i> <0,004	# <i>p</i> <0,01

* : les valeurs de p sont données par rapport au groupe OA (placebo)

: les valeurs de p sont déterminées par rapport au groupe ML-3000 2,5 mg/kg/j

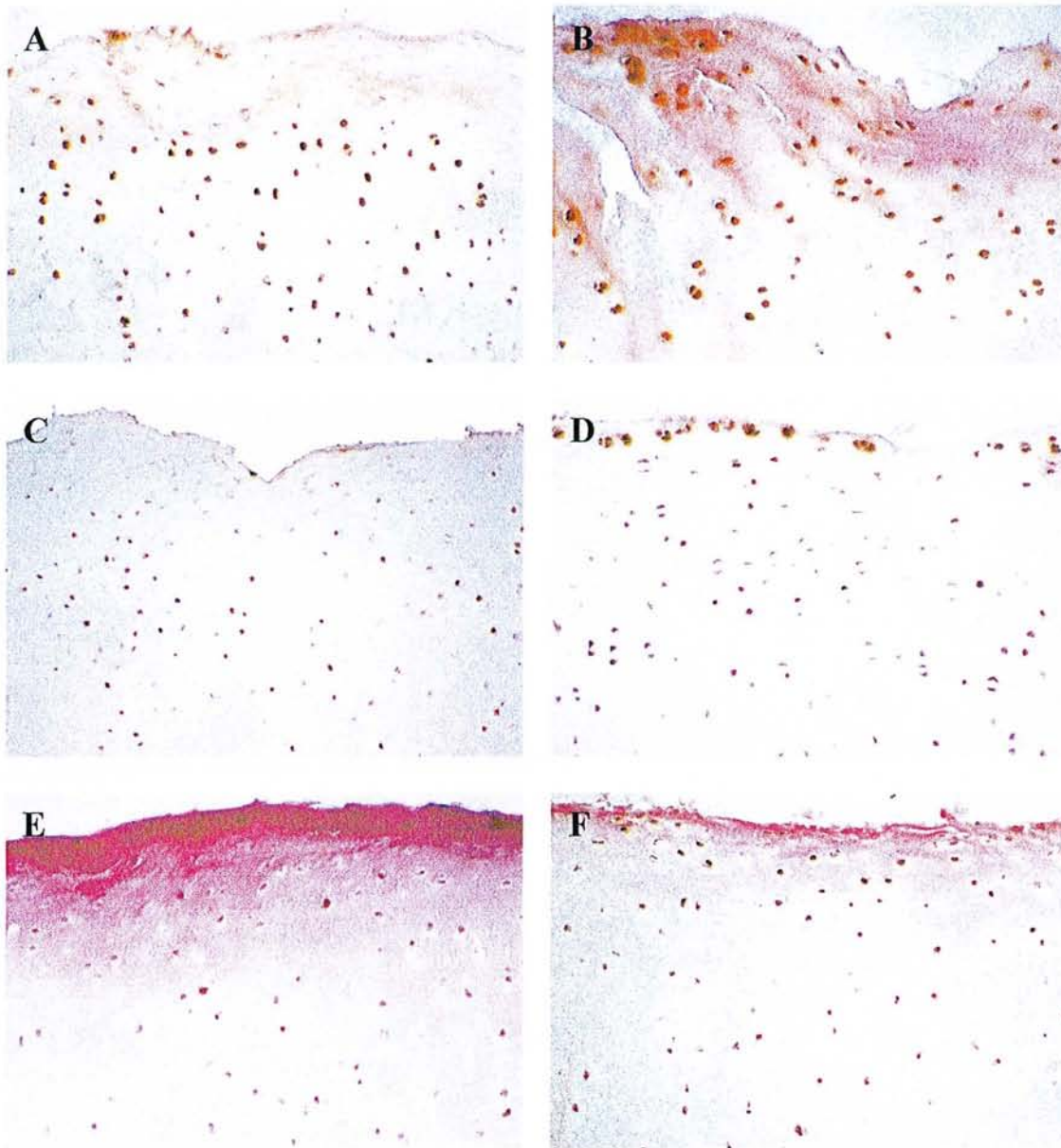
Environ 30% des chondrocytes dans le cartilage OA de chien sont positifs pour COX-2 (Tableau 34, Planche 10). Le ML-3000 produit une réduction significative du marquage dans le cartilage des chiens traités. Cette réduction est dépendante de la dose.

Planche 8.



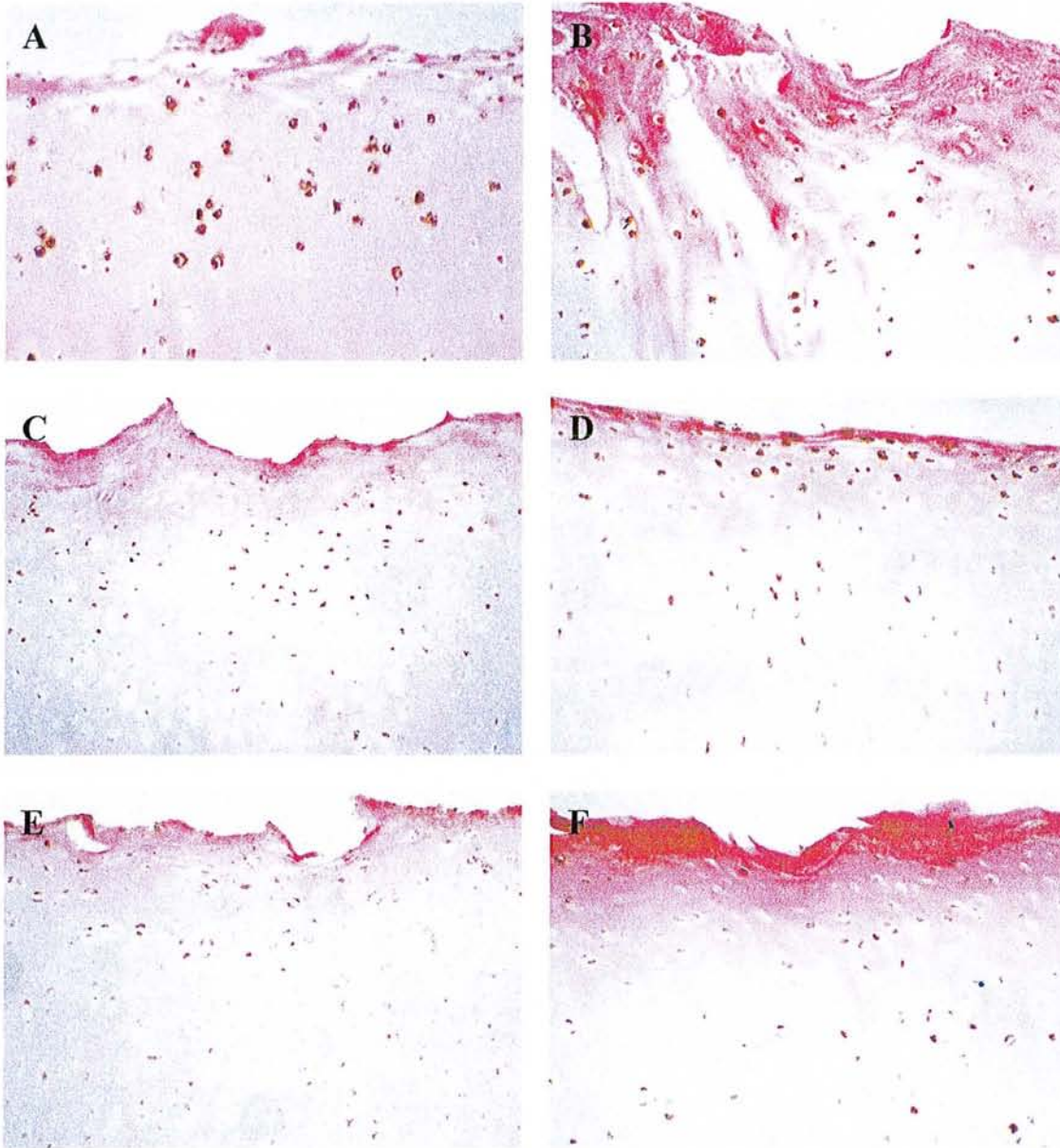
Sections représentatives de cartilage montrant l'expression de la caspase-3 active par immunohistochimie, dans les condyles fémoraux (gauche) et les plateaux tibiaux (droite), de chiens OA (placebo) (A et B) et de chiens traités par du ML-3000 2,5 mg/kg/j (C et D) et 5 mg/kg/j (E et F) (grossissement X100)

Planche 9

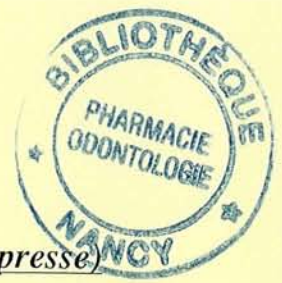


Sections représentatives de cartilage montrant l'expression de la iNOS par immunohistochimie, dans les condyles fémoraux (gauche) et les plateaux tibiaux (droite), de chiens OA (placebo) (A et B) et de chiens traités par du ML-3000 2,5 mg/kg/j (C et D) et 5 mg/kg/j (E et F) (grossissement X100)

Planche 10.



Sections représentatives de cartilage montrant l'expression de COX-2 par immunohistochimie, dans les condyles fémoraux (gauche) et les plateaux tibiaux (droite), de chiens OA (placebo) (**A** et **B**) et de chiens traités par du ML-3000 2,5 mg/kg/j (**C** et **D**) et 5 mg/kg/j (**E** et **F**) (grossissement X100)



REVISED MANUSCRIPT 2001/888 *Journal of Rheumatology (sous presse)*

**LICOFELONE (ML-3000), A DUAL INHIBITOR OF BOTH 5-LIPOXYGENASE AND
CYCLOOXYGENASES, REDUCES THE LEVEL OF CARTILAGE CHONDROCYTE
DEATH IN VIVO IN EXPERIMENTAL DOG OSTEOARTHRITIS: INHIBITION OF
PRO-APOPTOTIC FACTORS**

Christelle Boileau^{*}, Johanne Martel-Pelletier, Jean-Yves Jouzeau^{*}, Patrick Netter^{*},
Florina Moldovan, Stefan Laufer[†], Susanne Tries[‡], and Jean-Pierre Pelletier

ABSTRACT

Objective. The aim of this study was to evaluate the in vivo therapeutic efficacy of Licofelone, a novel competitive dual inhibitor of 5-lipoxygenase (5-LOX) and cyclooxygenases (COX) in chondrocyte death in the ligament transection canine model of osteoarthritis (OA), and to explore its effect on the level of important factors involved in the apoptotic phenomenon, i.e. caspase-3, COX-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS).

Methods. Cartilage specimens were obtained from three experimental groups of dogs: Group 1 — dogs subjected to a sectioning of the anterior cruciate ligament of the right knee and given placebo treatment; Groups 2 and 3 — operated dogs that received oral treatment with Licofelone (2.5 or 5.0 mg/kg/day, respectively) for eight weeks starting immediately after surgery. All dogs were killed eight weeks post-surgery. The cartilage level of chondrocyte death was detected by TUNEL reaction. The cartilage distribution of caspase-3, COX-2, and iNOS was documented by immunohistochemistry using specific antibodies, and other levels were quantified by morphometric analysis.

Results. In cartilage specimens from placebo-treated dogs, a large number of chondrocytes in the superficial layers stained positive for TUNEL reaction. Treatment with therapeutic concentrations of Licofelone (2.5 and 5.0 mg/kg/day) markedly reduced the level of chondrocyte apoptosis to the same extent in both therapeutic groups ($P < 0.0001$, $P < 0.002$, respectively). In these groups, the levels of caspase-3, COX-2 and iNOS in cartilage from both condyles and plateaus were also significantly decreased ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P < 0.0002$, respectively) compared to the control (placebo) group.

Conclusions. This study shows that Licofelone is an effective treatment in vivo capable of reducing the level of OA chondrocyte death. This effect is likely mediated by a decrease in the level of caspase-3 activity, which may be related to the reduced production of two major factors involved in chondrocyte apoptosis, NO and PGE₂. These findings may explain, at least in part, some of the mechanisms by which Licofelone reduces the progression of experimental OA.

Running footnote: Licofelone inhibits chondrocyte apoptosis

Key indexing terms: Licofelone, chondrocyte death, experimental OA

Osteoarthritis Research Unit, Hôpital Notre-Dame, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

*UMR 7561CNRS-UHP, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, Vandœuvre-Lès-Nancy, France

†Pharmaceutical Chemistry/Medicinal Chemistry, Eberhard Karls University, Tübingen, Germany

‡Merckle GmbH, Ulm, Germany

Supported in part by grants from Merckle GmbH, Ulm, Germany, the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Pôle Européen Universitaire (Nancy, France).

* C. Boileau, MSc; Doctoral Student

J. Martel-Pelletier, PhD; Professor of Medicine

* J-Y. Jouzeau, PharmD, PhD; Assistant Professor of Pharmacology

* P. Netter, MD, PhD; Professor of Medicine

F. Moldovan, MD, PhD; Assistant Professor of Medicine

† S. Laufer, PhD; Professor

‡ S. Tries, PhD; Head, Preclinical Development

J-P. Pelletier, MD; Professor of Medicine

Address correspondence and request reprints to: Jean-Pierre Pelletier, MD, Osteoarthritis Research Unit, Hôpital Notre-Dame, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1, telephone: 514-890-8000, ext. 26658, fax: 514-412-7582, email: dr@jppelletier.ca

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA), the most common form of arthritic disease, includes changes at all levels of all joint tissues, namely cartilage, synovial membrane, and the subchondral bone (1). The progressive loss of cartilage during the course of the disease is complex and likely has many origins. Based on results of the most recent studies on the pathophysiology of OA, the loss of cartilage matrix, one of the most characteristic morphological changes of OA, is related to several factors leading to an imbalance in synthetic and degradative processes (1,2). A great deal of work has focused on factors responsible for reducing the anabolism of OA chondrocytes. Today, the role of proinflammatory cytokines and nitric oxide (NO) seems preponderant (1-6). However, an additional factor recently proposed is the death of chondrocytes. A number of studies have demonstrated that apoptosis seems to be the most common phenomenon by which OA chondrocytes die (7-9). This phenomenon is accentuated by the loss of matrix indicating some kind of positive relationship between these two phenomena (10).

The chondrocyte death/apoptotic phenomenon in OA is complex and seems related to the excess synthesis of a number of factors having pro-apoptotic activity in cartilage and synovium. Among these, NO and prostaglandin E₂ (PGE₂) seem predominant (1-4,11). The synthesis of many of these factors is likely due to an excess production of cytokines. In addition, mechanical factors seem also to play an important role (12).

Our recent study, using an experimental dog model of OA created by an anterior cruciate ligament sectioning of the knee joint, has shown that Licofelone, a new anti-inflammatory drug with competitive dual inhibitory activity on 5-lipoxygenase (5-LO) and cyclooxygenase (COX), could reduce the progression of experimental OA (13). This effect was associated with a decrease in the levels of interleukin (IL)-1 β and matrix metalloprotease-1 (MMP-1). The aim of

the present study was to explore whether the effect of Licofelone in reducing cartilage damage could also be related to other mechanisms and, more particularly, to those related to chondrocyte death. In this study, we explored the effects of Licofelone on OA chondrocyte death, as well as the mechanisms believed to be important regulators of this phenomenon.

MATERIALS AND METHODS

Specimen selection. Specimens of cartilage obtained from dogs from different experimental groups included in our previous study (13) were used: Group 1 – dogs subjected to a sectioning of the anterior cruciate ligament of the right knee and given placebo treatment; Group 2 – OA dogs treated with Licofelone (2.5 mg/kg/day/orally); Group 3 - OA dogs treated with Licofelone (5 mg/kg/day/orally) beginning immediately after surgery.

In situ detection of apoptosis. Cartilage sections were fixed in TissuFix #2 (Laboratoires Gilles Chaput, Montreal, Quebec, Canada) for 24 hours and embedded in paraffin. Sections (5 μm) were floated onto Superfrost Plus slides (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). In situ detection of cell death was performed as previously described (14) using the Apoptag® Plus peroxidase in situ apoptosis detection kit (Intergen, Purchase, NY). Briefly, sections were digested with chondroitinase ABC (0.25 units/ml; Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario, Canada) in phosphate buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich Canada) for 45 minutes at 37°C, permeabilized with Triton X100 0.3% for 30 minutes, and further digested with proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich Canada) for 30 minutes at room temperature. Nucleotides labeled with digoxigenin were enzymatically added to the DNA by TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase). This was followed by binding to anti-digoxigenin antibody peroxidase conjugate,

which was detected with peroxidase substrate (Intergen). Sections were counterstained with eosin.

Immunohistochemical studies. Cartilage specimens from condyles and plateaus were processed for immunohistochemical analysis as described (15,16). Briefly, specimens were fixed in Tissufix #2 (Laboratoire Gille Chaput Inc.) for 24 hours then embedded in paraffin. Sections (5 μm) of paraffin-embedded specimens were placed on Superfrost Plus slides (Fisher Scientific), deparaffinized in toluene, hydrated in a graded series of ethanol, and preincubated with chondroitinase ABC (0.25 units/ml) in PBS for 90 minutes at 37°C or followed by heating at 65°C for 20 minutes in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0 (for caspase-3 immunodetection). After this, the specimens were washed in PBS, then permeabilized in Triton X100 (0.3%) for 30 minutes and washed again and then incubated with 0.3% hydrogen peroxide/methanol for 30 minutes. Slides were further incubated with Universal Blocking Solution (DAKO Diagnostics Canada Inc., Mississauga, Ontario, Canada) for 30 minutes, blotted and then overlaid for 18 hours at 4°C in a humidified chamber with: (1) a rabbit polyclonal (IgG) anti-caspase-3 antibody (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; R&D Systems, Minneapolis, MN), which recognized only the mature form (p20 subunit) of the enzyme, (2) a rabbit polyclonal antibody (IgG) against iNOS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA); and (3) a rabbit polyclonal antibody (IgG) against rhCOX-2 (dilution 1/250, Oxford Biomedical Research Inc., Oxford, MI).

Each slide was washed three times in PBS (pH 7.4) then stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit: Vector Laboratories, Burlingame, CA). This method entails incubation in the presence of the biotin conjugated secondary antibody for 45 minutes at room temperature followed by the addition of the avidin-biotin-peroxidase complex for 45

minutes. All incubations were carried out in a humidified chamber, and the color developed with DAB substrate-chromogen (DAKO Diagnostics Canada Inc.) containing hydrogen peroxide.

To determine the specificity of staining, three control procedures were employed according to the same experimental protocol: (1) use of adsorbed immune serum (1h, 37°C) with a 10 to 20-fold molar excess of recombinant or purified antigen; (2) omission of the primary antibody; and (3) substitution of the primary antibody with an autologous preimmune serum. All of these antibodies have been demonstrated in previous studies to be specific for these dog proteins (14,17).

Several sections were made from each block of cartilage, and slides from each specimen were processed for immunohistochemical analysis. Each section was examined under a light microscope (Leitz Orthoplan: Wild Leitz, Ville St. Laurent, Quebec, Canada) and photographed with Kodak Ektachrome 64 ASA film (Rochester, NY).

Morphometric analysis. Three sections from each femoral condyle and tibial plateau specimen were examined using a Leitz Diaplan microscope (X40), and each section was scored separately. These data were then integrated as a mean for each specimen. The number of chondrocytes staining positive in the superficial zone (superficial and upper intermediate layers) of cartilage for TUNEL reaction, caspase-3, COX-2 or iNOS was estimated as previously described (15,17). Briefly, each section was divided into three different areas at the superficial layers of cartilage. For each specimen, it was ensured before the evaluation that an intact cartilage surface could be detected for use as a marker to validate the morphometric analysis.

The cell count scores were determined separately for the lateral and medial sides of the condyles and plateaus. The total number of chondrocytes and the number of chondrocytes staining positive were then quantitated separately for the superficial zone. The final results were

expressed as the percentage of positive chondrocytes. The maximum score for each cartilage specimen was 100%. Each slide was evaluated by two independent observers under blinded conditions (CB and JPP): variation between the observers' findings was <5%.

RESULTS

Drug administration and circulating drug level. Licofelone was administered twice daily (8:00 AM and 4:00 PM) with food, at a total daily dose of 2.5 mg/kg and 5.0 mg/kg (13). The drug was given orally in a capsule. Drug treatment was initiated immediately after surgery and continued for 8 weeks, after which time the animals were killed. The plasma concentration of Licofelone was measured at 4 weeks and at the end of the study. The 4-week samples were obtained at 2 hours (maximum concentration [C_{max}]) and the 8-week samples at 12 hours (minimum concentration [C_{min}]) after the drug was administered. The mean \pm SEM 2-hour postadministration serum level (C_{max}) of Licofelone was $371 \pm 119 \mu\text{g/ml}$ and $629 \pm 331 \mu\text{g/ml}$ in the 2.5 mg/kg/day and 5.0 mg/kg/day groups, respectively. These levels were comparable with those in humans after the administration of Licofelone in single doses of 100 mg or 200 mg (Merckle GmbH: internal file). The drug levels at the time the dogs were killed (C_{min}) were $110 \pm 17 \mu\text{g/ml}$ and $200 \pm 17 \mu\text{g/ml}$ in the 2.5 mg/kg/day and 5.0 mg/kg/day groups, respectively, which are similar to those found in the phase II and III clinical trials in OA patients (Merckle GmbH: internal file).

Cartilage chondrocyte death (Table 1, Figure 1). A large percentage of chondrocytes in the superficial layers of OA cartilage from placebo-treated dogs stained positive for the TUNEL reaction. We have previously demonstrated that in this OA model, the level of TUNEL positive cells found in OA cartilage was statistically higher than that found in normal cartilage (4).

Treatment with therapeutic levels of Licofelone very significantly reduced the number of apoptotic chondrocytes in the OA cartilage. The extent of reduction was quite similar for both dosages of the drug that were tested in this study. The control done by omission of terminal deoxynucleotidyl transferase showed only background staining (not shown).

Immunohistochemistry

Caspase-3 (Table 2, Figure 2). About 30% of the chondrocytes in the superficial layers of OA cartilage from placebo-treated dogs stained positive for active caspase-3. In dogs treated with Licofelone, a marked and significant decrease in the number of chondrocytes staining positive for this enzyme was observed. The extent of this reduction in the level of caspase-3 was more marked with the 5 mg/kg/day than the 2.5 mg/kg/day dose regimen. Controls showed only background staining (not shown).

iNOS (Table 3, Figure 3). A large number of chondrocytes in the superficial layers of OA cartilage from condyles and plateaus demonstrated a positive staining for iNOS. Specimens from the two groups of dogs treated with Licofelone showed a significant reduction in the percentage of positive chondrocytes. There were, however, no differences between the two therapeutic groups, either in femoral condyles or tibial plateaus, concerning the extent of reduction. Controls showed only background staining.

Cox-2 (Table 4, Figure 4). Over 30% of the chondrocytes in the superficial layers of OA cartilage, both in condyles and plateaus, expressed COX-2. There was a very significant decrease in the number of cells expressing COX-2 in specimens from condyles and plateaus in the two experimental groups treated with Licofelone. There was a slight tendency for the effect to be more marked in the dogs treated with the highest dosage of the drug. Controls showed only background staining (not shown).

DISCUSSION

This study demonstrates that under actual experimental conditions, Licofelone is a potent inhibitor of OA chondrocyte death *in vivo*. This new anti-inflammatory compound was previously reported to be a potent *in vivo* inhibitor of 5-LOX and COX in experimental dog OA, as well as an effective drug capable of reducing the development of cartilage degradation (13). The present study gives new information on the potential mechanisms by which this drug could exert its cartilage-sparing effects.

The participation of chondrocyte death by apoptosis in cartilage destruction is very likely during the OA process (3,6,8-10,18). The reduction in the number of living cells, particularly in the superficial layers of OA cartilage where a great deal of extracellular matrix degradation has taken place, is certainly an important factor limiting the capacity of this tissue for self-repair (5). Moreover, the death of chondrocytes must lead to the release of a number of catabolic factors such as proteases, which could also contribute to cartilage matrix degradation. In fact, a previous study in an experimental OA model demonstrated that an agent that can reduce the level of chondrocyte apoptosis was also able to protect against the progression of cartilage lesions (19). The relevance of these specific anti-arthritic agents toward their potential use for the treatment of clinical OA is questionable since one may argue that the administration of agents able to specifically and selectively inhibit apoptosis may also increase the risk of inducing malignant disease when given systemically. In fact, drugs that can induce apoptosis in intestinal cells have been clearly established as reducing the incidence of certain colon cancers (20,21). In regard to OA, there is a need for agents that will inhibit apoptosis rather selectively in the joints or at the site of inflammation.

The mechanisms leading to OA chondrocyte death/apoptosis have been extensively studied. Recent publications have demonstrated that a number of pathways, linked together, are involved in this phenomenon. For instance, the implication of the caspase cascade has recently been documented (22) and is to some extent related to the excessive production of NO within the OA joint and more particularly by chondrocytes (23,24). Furthermore, the exact mechanisms(s) by which NO induces chondrocyte apoptosis remains to be elucidated. Recent reports indicate several possibilities, including direct DNA damage, generation of peroxynitrite, and inactivation of antioxidant enzymes (25-28). Results of studies using human leukemic cell lines indicate that NO might induce apoptosis via mitochondria damage and, more precisely, by cytochrome c release leading to activation of the caspase enzymes (29).

The cytosolic aspartate-specific proteases (caspases) involve a family of enzymes responsible for the "ordered" disassembly of cells (22). Caspase-8, caspase-9, and caspase-3 are the primary enzymes involved in cell apoptosis. These enzymes induce cell death by a number of mechanisms, including DNA fragmentation and inactivation of the proteins that protect cells against apoptosis (22,30). They are present in the cytoplasm as proenzymes and can undergo self-activation or be activated in a cascade-like manner by enzymes with similar specificity. Caspase-9 is activated in response to agents or insults that induce the release of cytochrome c from the inner mitochondrial membrane (31). Caspase-8 is activated by the cytoplasmic death domains of the receptors. Caspase-8 and caspase-9 can activate caspase-3, which could amplify the caspase-8 and caspase-9 signals. Upon activation, caspase-3 cleaves vital intracellular proteins and additional caspases.

Moreover, recent studies from our laboratory have demonstrated that the induction of apoptosis by NO, in OA chondrocytes, is mediated via the induction of COX-2 gene expression

and subsequent increase in the production of endogenous PGE₂ (11). The exact mechanism by which PGE₂ is involved in chondrocyte apoptosis is actually under exploration in our laboratory. This finding is an interesting one because in cancer cells, prostaglandins are believed to have an inverse effect by having anti-apoptotic properties (20,21,32).

The actual study demonstrated that Licofelone was capable of reducing dramatically OA chondrocyte death/apoptosis, particularly in the lesional area of the cartilage. This effect was present in concentrations of Licofelone which were within the therapeutic range (13). This effect was also closely associated with a reduction in the level of the mature form of caspase-3, explaining the mechanism by which the drug could reduce chondrocyte death/apoptosis. Moreover, Licofelone was found to inhibit significantly the expression of both iNOS and COX-2. Taken together, these results clearly show that this drug reduces chondrocyte death/apoptosis by inhibiting the production of two major factors which have been identified as being involved in the activation of the caspase cascade, namely NO and PGE₂. There are several hypotheses to explain the effects of Licofelone on these pathways. Firstly, this drug was demonstrated as reducing the synthesis of IL-1 β by the synovial cells in experimental dog OA (13). This action could possibly be related to the capacity of Licofelone to inhibit the activity of 5-LOX and the synthesis of LTB₄ (33). Recent studies have also identified that a mutual cross-talking exists between the iNOS and COX pathways which may provide an additional explanation for the action of Licofelone. These findings can be summarized as follows: the level of COX-2 is autoregulated by PGE₂ and upregulated by NO, the level of iNOS is autoregulated by NO and upregulated by PGE₂ (34). Therefore, Licofelone being a potent inhibitor of COX-2, the inhibition of PGE₂ production could explain the reduction in the level of COX-2 and iNOS. Moreover, recent findings from our laboratory have indicated that LTB₄ could also upregulate

COX-2 expression (35), and therefore, the inhibition of 5-LOX by Licofelone may provide an additional explanation for the reduction in the level of COX-2 induced by this drug in OA chondrocytes.

In summary, this study demonstrates that Licofelone, a new anti-inflammatory drug with dual balanced inhibitory activity against COX and 5-LOX, reduces chondrocyte death/apoptosis in vivo in OA cartilage. This effect is regulated by the inhibition of two potent pro-apoptotic pathways in chondrocytes, namely COX-2 and iNOS, and the subsequent decrease in the activation of the caspase cascade. These findings provide additional information about the possible mechanisms by which Licofelone could reduce the progression of the structural changes of experimental dog OA.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Heather Yampolsky and Santa Fiori for their invaluable assistance in the preparation of the manuscript and Dr. Dragan Jovanovic for his scientific expertise.

REFERENCES

1. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis & Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. 14th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2000:2195-245.
2. Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Lajeunesse D. Biochemical factors in joint articular tissue degradation in osteoarthritis. In: Reginster JY, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Henrotin Y, editors. *Osteoarthritis: Clinical and Experimental Aspects*. Berlin: Springer-Verlag; 1999:156-87.
3. Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:263-8.
4. Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR, Currie MG et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998;41:1275-86.
5. Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins PD, Evans CH. Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:377-9.
6. Lotz M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 1999;25:269-82.
7. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995;146:75-85.
8. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes

- die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998;41:284-9.
9. Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000;27:455-62.
 10. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1632-8.
 11. Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 2000;165:3402-10.
 12. Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B et al. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 2000;381:205-12.
 13. Jovanovic DV, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Joliceur FC, Reboul P, Laufer S et al. The in-vivo dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by ML-3000 reduces the progression of experimental osteoarthritis. Suppression of Collagenase-1 and interleukin-1beta synthesis. *Arthritis Rheum* 2001;44:2320-2330.
 14. Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* 2000;43:1290-9.

15. Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage *in situ*: *in vitro* mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* 1997;40:1653-61.
16. Pelletier JP, Faure MP, Di Battista JA, Wilhelm S, Visco D, Martel-Pelletier J. Coordinate synthesis of stromelysin, interleukin-1, and oncogene proteins in experimental osteoarthritis. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 1993;142:95-105.
17. Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Currie MG et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol* 1999;26:2002-14.
18. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001;44:1237-47.
19. Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T, Hirasawa Y, Lotz M, Amiel D. Effect of hyaluronan on chondrocyte apoptosis and nitric oxide production in experimentally induced osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000;27:1713-20.
20. Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:1960-8.
21. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J*

Med 2000;342:1946-52.

22. Thornberry N, Lazebnik YA. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6.
23. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI et al. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991;147:3915-20.
24. Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur MG, Tzeng E, Billiar TR et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for an inducible "neuronal-like" nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995;182:2097-102.
25. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3030-4.
26. Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY. Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1995;270:16487-90.
27. Dobashi K, Pahan K, Chahal A, Singh I. Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C6 glial cells. *J Neurochem* 1997;68:1896-903.
28. Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M et al. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem* 1995;270:21035-9.
29. Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, Droge W, Schirmacher V, Umansky V. Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release. *Blood* 1999;93:2342-52.

30. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-65.
31. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
32. Prescott SM. Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer? *J Clin Invest* 2000;105:1511-3.
33. Rainsford KD, Ying C, Smith F. Effects of 5-lipoxygenase inhibitors on interleukin production by human synovial tissues in organ culture: comparison with interleukin-1-synthesis inhibitors. *J Pharm Pharmacol* 1996;48:46-52.
34. Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J. Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of COX-2 and iNOS. *J Rheumatol* 2001;28:2509-2519.
35. He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA. The synthesis of interleukin-1beta, tumour necrosis factor- α and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human OA synovial membrane explants: Interactions with anti-inflammatory cytokines . *J Rheumatol* 2001;(In press).

Table 1. Level of chondrocyte death (TUNEL reaction) in canine knee cartilage*

Group	No. of Animals	% positive cells	
		Femoral condyles	Tibial plateaus
OA (placebo)	7	30.8 ± 1.9	31.0 ± 2.4
Licofelone 2.5 mg/kg/day	7	9.6 ± 1.9 (<i>P</i> <0.0001)	12.0 ± 1.7 (<i>P</i> <0.0001)
Licofelone 5.0 mg/kg/day	7	11.5 ± 1.9 (<i>P</i> <0.0001)	14.0 ± 1.8 (<i>P</i> <0.0002)

*Values are the mean ± SEM. The osteoarthritis (OA) group was treated with the placebo. The Licofelone-treated groups received 2.5 mg/kg or 5 mg/kg of Licofelone orally each day for 8 weeks, beginning immediately after surgery. All dogs were killed and tissues examined at 8 weeks. Statistical analysis by Mann-Whitney U test. P values were compared to OA control group.

Table 2. Caspase-3 level in canine knee cartilage*

Group	No. of Animals	% positive cells	
		Femoral condyles	Tibial plateaus
OA (placebo)	7	30.5 ± 2.7	29.6 ± 3.4
Licofelone 2.5 mg/kg/day	7	6.6 ± 1.5 (<i>P</i> < 0.0001)	5.4 ± 1.1 (<i>P</i> < 0.0001)
Licofelone 5.0 mg/kg/day	7	3.7 ± 1.1 (<i>P</i> < 0.0001) †(<i>P</i> < 0.05)	2.5 ± 0.6 (<i>P</i> < 0.0001) †(<i>P</i> < 0.04)

* Values are the mean ± SEM. See Table 1 for explanations and definitions.

P value versus the OA group, by Mann-Whitney U test.

† P value versus Licofelone 2.5 mg/kg/day, by Mann-Whitney U test.

Table 3. iNOS level in canine knee cartilage*

Group	No. of Animals	% positive cells	
		Femoral condyles	Tibial plateaus
OA (placebo)	7	24.8 ± 2.9	29.4 ± 2.3
Licofelone 2.5 mg/kg/day	7	12.1 ± 0.9 (<i>P</i> <0.002)	11.1 ± 1.4 (<i>P</i> <0.001)
Licofelone 5.0 mg/kg/day	7	10.7 ± 1.7 (<i>P</i> <0.002)	11.1 ± 1.0 (<i>P</i> <0.001)

* Values are the mean ± SEM. See Table 1 for explanations and definitions.

P value versus the OA group, by Mann-Whitney U test.

Table 4. COX-2 level in canine knee cartilage*

Group	No. of Animals	% positive cells	
		Femoral condyles	Tibial plateaus
OA (placebo)		31.1 ± 1.4	30.1 ± 2.0
Licofelone 2.5 mg/kg/day	7	15.9 ± 1.0 (<i>P</i> <0.001)	16.6 ± 1.2 (<i>P</i> <0.001)
Licofelone 5.0 mg/kg/day	7	10.8 ± 1.1 (<i>P</i> <0.001) †(<i>P</i> <0.004)	10.4 ± 1.3 (<i>P</i> <0.001) †(<i>P</i> <0.01)

* Values are the mean ± SEM. See Table 1 for explanations and definitions.

P value versus the OA group, by Mann-Whitney U test.

† P value versus Licofelone 2.5mg/kg/day group, by Mann-Whitney U test.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Representative sections of cartilage showing in situ detection of chondrocyte death by TUNEL reaction staining in femoral condyles (left) and tibial plateaus (right). **A** and **B**, placebo-treated OA dog. **C** and **D**, OA dog treated with Licofelone at 2.5 mg/kg/day. **E** and **F**, OA dog treated with Licofelone at 5.0 mg/kg/day. (Original magnification X 100)

Figure 2. Representative sections of cartilage, showing immunostaining for caspase-3 in femoral condyles (left) and tibial plateaus (right). **A** and **B**, placebo-treated OA dog. **C** and **D**, OA dog treated with Licofelone at 2.5 mg/kg/day. **E** and **F**, OA dog treated with Licofelone at 5.0 mg/kg/day. (Original magnification X 100)

Figure 3. Representative sections of cartilage, showing immunostaining for iNOS in femoral condyles (left) and tibial plateaus (right). **A** and **B**, placebo-treated OA dog. **C** and **D**, OA dog treated with Licofelone at 2.5 mg/kg/day. **E** and **F**, OA dog treated with Licofelone at 5.0 mg/kg/day. (Original magnification X 100)

Figure 4. Representative sections of cartilage, showing immunostaining for COX-2 in femoral condyles (left) and tibial plateaus (right). **A** and **B**, placebo-treated OA dog. **C** and **D**, OA dog treated with Licofelone at 2.5 mg/kg/day. **E** and **F**, OA dog treated with Licofelone at 5.0 mg/kg/day. (Original magnification X 100)

Figure 1.

Femoral Condyles

Tibial Plateaus

Osteoarthritic

**ML-3000
(2.5 mg/kg/day)**

**ML-3000
(5 mg/kg/day)**

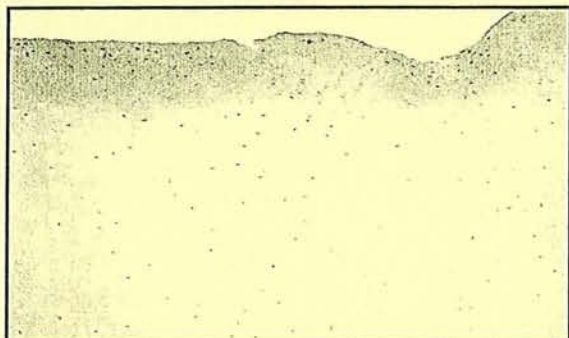
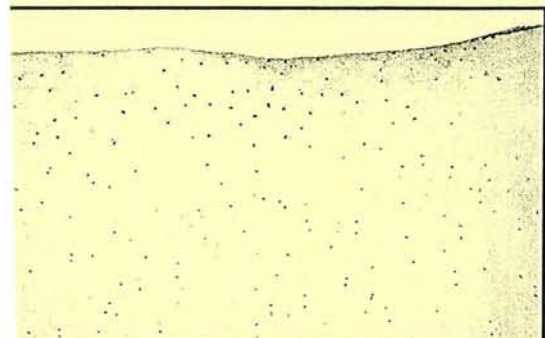
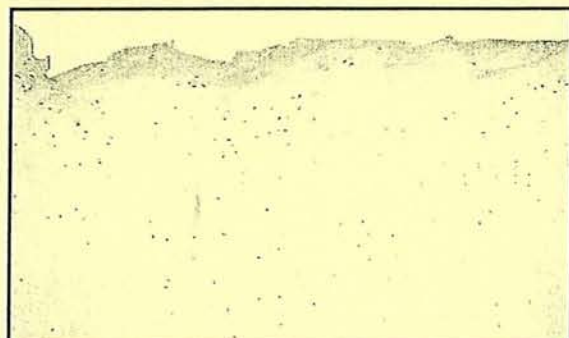
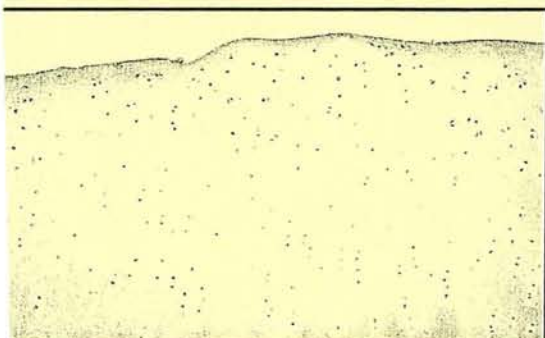
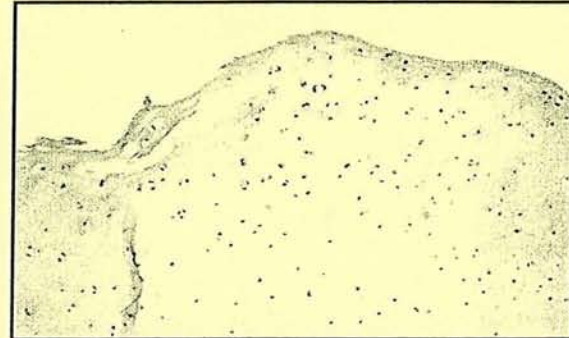
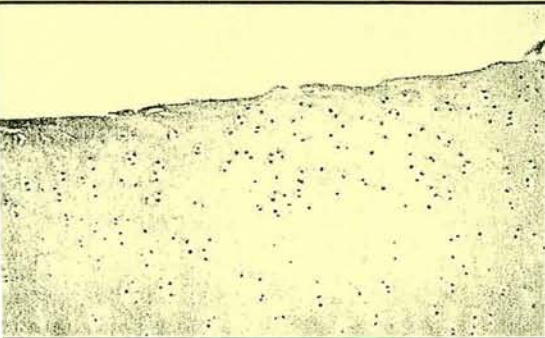


Figure 2.

Femoral Condyles

Tibial Plateaus

Osteoarthritic

**ML-3000
(2.5 mg/kg/day)**

**ML-3000
(5 mg/kg/day)**

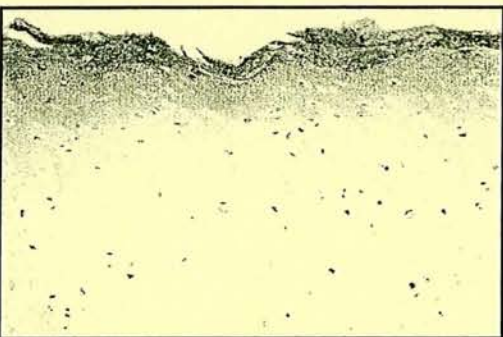
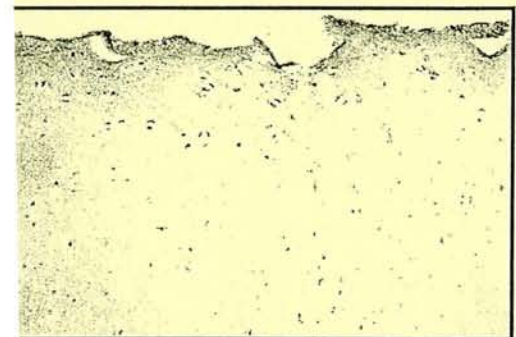
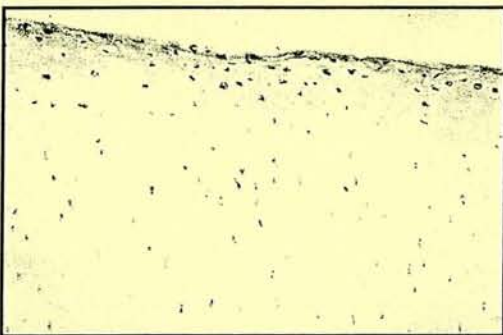
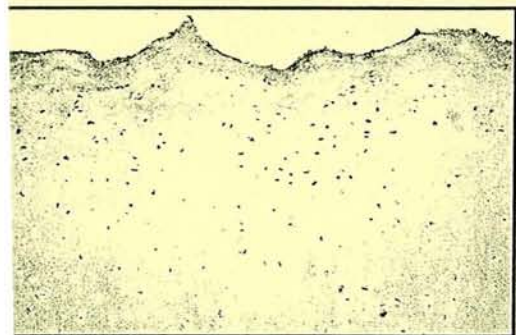
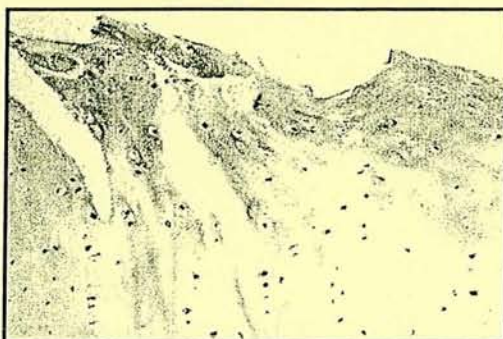


Figure 3.

Femoral Condyles

Tibial Plateaus

Osteoarthritic

**ML-3000
(2.5 mg/kg/day)**

**ML-3000
(5 mg/kg/day)**

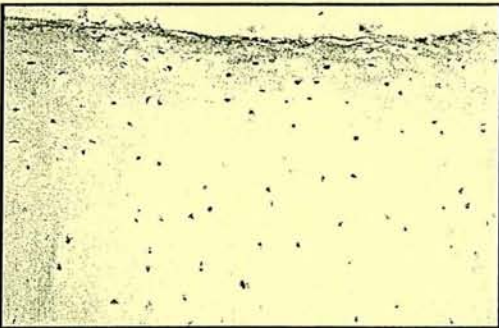
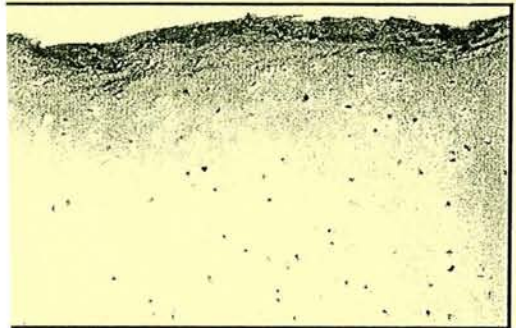
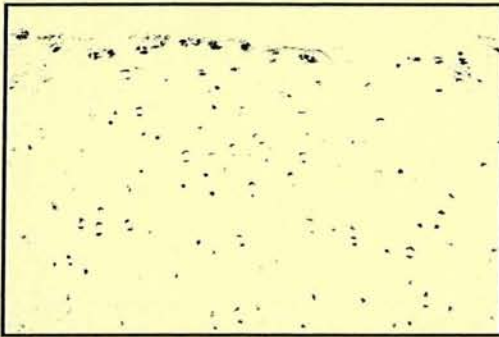
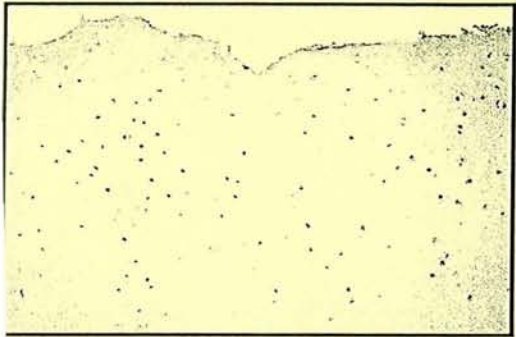
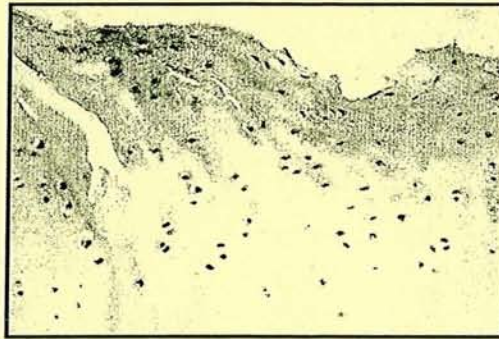
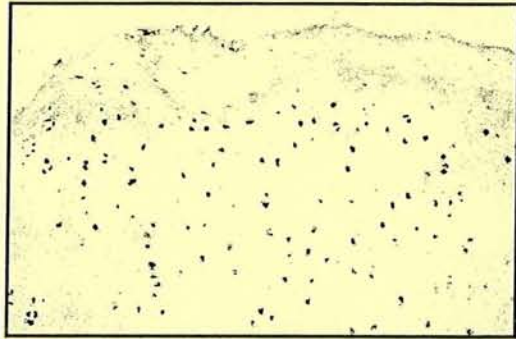


Figure 4.

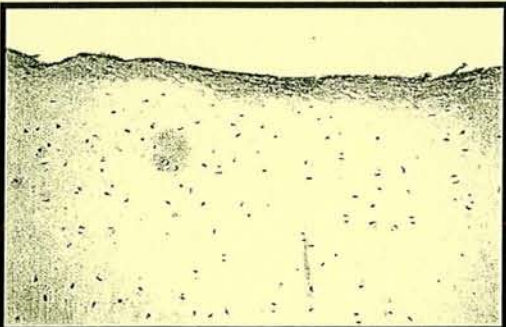
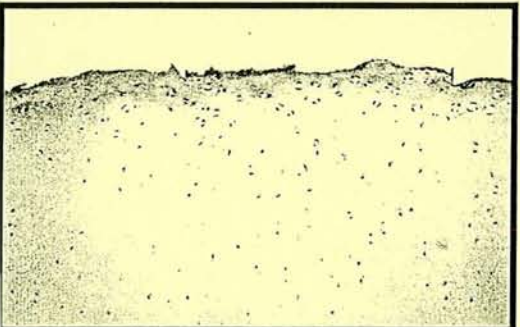
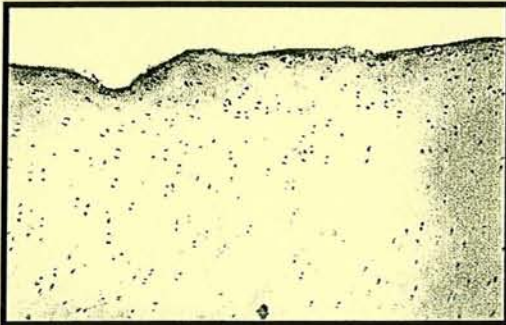
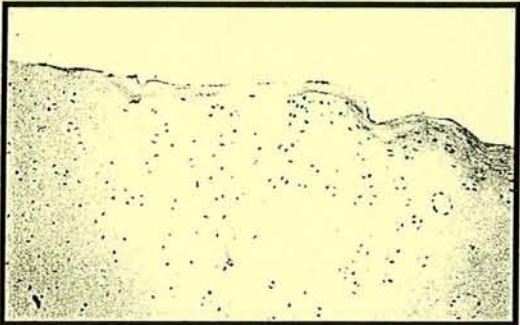
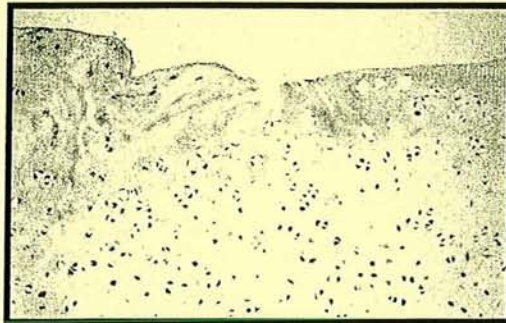
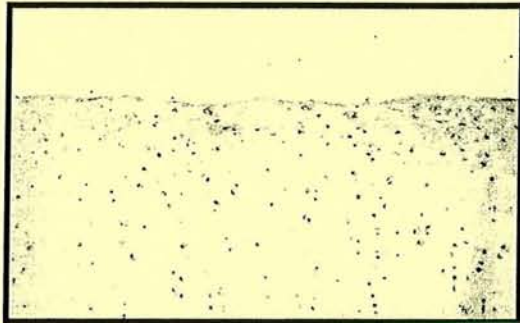
Femoral Condyles

Tibial Plateaus

Osteoarthritic

**ML-3000
(2.5 mg/kg/day)**

**ML-3000
(5 mg/kg/day)**



Discussion de la 3^{ème} et de la 4^{ème} parties

Les AINS, grâce à leur pouvoir inhibiteur sur les COXs, sont largement prescrits pour leurs propriétés antalgique et/ou anti-inflammatoire dans le traitement symptomatique de l'arthrose. Des molécules ayant une tolérance digestive améliorée (Silverstein et coll, 2000 ; Wallace et coll, 1994), sont donc susceptibles d'être administrées de façon chronique chez le patient arthrosique. Cependant, cette administration ne doit pas s'accompagner d'effets délétères sur le cartilage, comme cela l'a été suggéré pour l'indométacine (Rashad et coll, 1989). Le but de ces deux études expérimentales était donc d'évaluer les effets d'inhibiteur sélectif de COX-2, le Rofécoxib, et d'inhibiteur mixte COX/5-LOX, le ML-3000, sur le cartilage articulaire, dans deux modèles expérimentaux d'arthrose. Ces modèles nous ont permis de réaliser une évaluation séquentielle des modifications cartilagineuses, en s'affranchissant de l'hétérogénéité des formes cliniques de l'arthrose humaine. D'autre part, il paraissait intéressant d'étudier l'expression de deux protéines de la réaction inflammatoire, iNOS et COX-2, dont l'activité peut être modulée par ces molécules et qui sont susceptibles de participer à la survie chondrocytaire. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence l'existence de régulations croisées entre ces deux voies inductibles (Salvemini, 1997 ; Cirino, 1998) et notamment une activation fonctionnelle de COX-2 par les espèces dérivées du NO dans les chondrocytes (Nédélec et coll, 2001).

Dans le modèle d'arthrose expérimentale au MIA, les expériences ont confirmé qu'il existe une différence d'incorporation de sulfate radiomarqué selon la zone de la rotule considérée. En effet, la partie centrale du cartilage rotulien montre une baisse de l'incorporation, traduisant une diminution de la biosynthèse des protéoglycanes, alors que le phénomène inverse est observé en périphérie. Ces résultats sont cohérents avec ce qui a déjà été décrit dans ce modèle chez le rat (Guingamp et coll, 1997) et chez la souris et semblent caractéristiques des arthroses induites par les perturbations du métabolisme chondrocytaire (Van der Kraan et coll, 1992). Ce phénomène reproduit les différences d'anabolisme des protéoglycanes du cartilage rapportées après une injection intra-articulaire d'IL-1 (Gegout et coll, 1994) et serait un bon reflet de la sévérité de l'atteinte articulaire.

Notre étude montre que, aux doses testées, les AINS n'ont pas d'effet significatif sur l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage, suggérant un effet chondroneutre des molécules dans nos conditions expérimentales. Plusieurs études se sont intéressées aux effets des AINS sur la biosynthèse des protéoglycanes du cartilage *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, les AINS ont un effet inhibiteur sur la biosynthèse des protéoglycanes à fortes concentrations (Bjelle et Eronen, 1991 ; Collier et Ghosh, 1991), même si certains auteurs suggèrent qu'ils pourraient se distinguer les uns des autres par leur capacité à favoriser la fixation des facteurs de croissance sur les chondrocytes (Dingle et Parker, 1997). Il faut cependant remarquer que, si l'on considère l'exemple du naproxène, un effet inhibiteur (Muir et coll, 1988 ; Dingle, 1999) ou une absence d'effet (Brandt et Albrecht, 1990 ; Basleer et coll, 1992 ; Smith et coll, 1995) ont été rapportés sur le métabolisme des protéoglycanes. Ceci souligne l'influence des conditions expérimentales (espèce, cartilage sain ou pathologique, durée d'exposition) sur l'interprétation des résultats. De même, nos résultats sont assez cohérents avec la majorité des études *in vivo*. En effet, si l'acide tiaprofénique (Pelletier et Martel-Pelletier, 1991) et, à un

degré moindre, le naproxène (Ratcliffe et coll, 1993), ont démontré un effet protecteur sur le cartilage, et que certains effets délétères ont été observés avec les salicylés (Brandt et Palmoski, 1984) ou l'indométacine (Desa et coll, 1989 ; Pettipher et coll, 1989), les AINS n'ont généralement pas d'effet majeur sur le cartilage. D'ailleurs, les potentialités de l'acide tiaprofénique pourraient relever de propriétés particulières, indépendantes de l'inhibition des COXs, comme l'inhibition des MMPs (Pelletier et coll, 1989 ; Sadowski et Steinmeyer, 2001). On ne dispose actuellement que de peu de données sur les effets des inhibiteurs sélectifs de COX-2 sur le cartilage. Cependant, nous avons montré qu'à une posologie (3 mg/kg/j), correspondant à plus de deux fois la DE₅₀ sur les paramètres d'efficacité anti-inflammatoire (Chan et coll, 1999), le rofécoxib ne perturbe pas la biosynthèse des protéoglycanes. Bien que nous ne connaissions pas la contribution respective des deux isoformes de COX dans le cartilage, le concept de sélectivité des AINS pour les COXs semble transposable dans ce tissu (Blanco et coll, 1999), d'autant que l'expression de COX-2 a été mise en évidence dans le cartilage de patients arthrosiques (Amin et coll, 1997). Nos résultats ne mettent pas en évidence de différence liée à la sélectivité d'inhibition des COXs par les AINS. Cependant, ils suggèrent qu'un inhibiteur sélectif de COX-2 serait bien toléré par le cartilage pathologique, même à une posologie excessive.

L'étude histologique de la sévérité de l'atteinte arthrosique a confirmé l'existence chez les rats MIA, de lésions modérées du cartilage, mimant certains traits de l'arthrose humaine (Bentley, 1974): nids de chondrocytes (« cluster ») ou mort cellulaire, érosion du cartilage et remodelage osseux. En effet, le remodelage de l'os sous-chondral est observé dès J10, comme c'est le cas précocément dans d'autres modèles expérimentaux (Collins et coll, 1994 ; Messner et coll, 2000). De plus, les lésions observées au niveau des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux sont de même nature et sont réparties de façon homogène, contrairement à l'hétérogénéité rapportée entre les zones portantes ou non portantes dans les modèles d'arthrose par instabilité (Van der Kraan et coll, 1989). Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé d'effets des AINS sur la sévérité des lésions et notamment pas de déplétion supplémentaire en protéoglycanes (bleu de Toluidine) dans les couches superficielles du cartilage. Ces résultats confirment la chondroneutralité des AINS dans ce modèle. Il faut cependant signaler que les effets protecteurs de certaines molécules, y compris le naproxène (Ratcliffe et coll, 1993), ont toujours été rapportés dans le modèle par section ligamentaire. Pour le rofécoxib, l'absence d'effet est cohérente avec l'absence d'effet aggravant sur le pincement de l'interligne chez le patient arthrosique, après un an d'utilisation (Tindall, 2000).

Nous avons confirmé que l'apoptose chondrocytaire est nettement augmentée dans le modèle au MIA (Guingamp et coll, 1998), aussi bien par la technique de Tunel que par la détection de la caspase-3 active. La participation de la mort chondrocytaire par apoptose dans la destruction du cartilage au cours du processus arthrosique est maintenant largement documentée, tant chez l'Homme que chez l'animal (Amin et Abramson, 1998 ; Lotz et coll, 1999 ; Blanco et coll, 1998 ; Kim et coll, 2000 ; Hashimoto et coll, 1998 ; Pelletier et coll, 2001). La réduction du nombre de cellules, notamment dans les couches superficielles du cartilage arthrosique, où a été observée une dégradation importante de la matrice extracellulaire, est certainement un des mécanismes importants dans la capacité des tissus à se

régénérer (Studer et coll, 1999), d'ailleurs la perte d'adhésion du chondrocyte à la matrice extracellulaire pourrait favoriser l'apoptose (Cao et Yang, 1999). Qui plus est, la mort des chondrocytes peut favoriser la libération d'un certain nombre de facteurs cataboliques, comme des protéases (Tetlow et coll, 2001 ; Lang et coll, 2000), susceptibles de favoriser la dégradation de la matrice cartilagineuse. Il pourrait donc exister une sorte de cercle vicieux auto-entretenu entre l'apoptose et la dégradation de la matrice extracellulaire. Les protéases cytosoliques aspartate-spécifiques ou caspases, dont la caspase-8, la caspase-9 et la caspase-3 sont les premières enzymes impliquées dans la mort cellulaire par apoptose. Elles induisent la mort cellulaire par un certain nombre de mécanismes, dont la fragmentation de l'ADN et l'inactivation des protéines protégeant les cellules de l'apoptose (Thornberry et Lazebnik, 1998 ; Nagata, 1997). Elles sont présentes dans le cytoplasme sous la forme de pro-enzymes et elles peuvent subir une auto-activation ou être activées par la cascade des caspases par des enzymes ayant une spécificité identique. La caspase-9 est activée en réponse à des agents ou à des stimuli qui induisent la libération de cytochrome c de la membrane interne des mitochondries (Li et coll, 1997). La caspase-8 est activée par des signaux transmis à partir des récepteurs cytoplasmiques. Les caspases-8 et -9 peuvent activer la caspase-3, qui peut elle-même amplifier le signal des deux autres. Après activation, la caspase-3 clive des protéines vitales intra-cellulaires et d'autres caspases. Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé un pourcentage plus important de cellules apoptotiques avec la technique de Tunel qu'avec la détection de la caspase-3 active. Une explication possible est qu'un nombre non négligeable de cellules nécrotiques pourrait être détecté par la technique de Tunel (Grasl-Kraupp et coll, 1995), ce qui conduirait à une surestimation du phénomène apoptotique, d'autant que le MIA n'est pas dénué de toxicité expérimentale *in vitro* (Cournil et coll, 2000). Dans ce cas, l'expression de la caspase-3 active semble l'indicateur le plus fiable du processus apoptotique. Les AINS ne modifient pas ce paramètre, ni d'ailleurs les résultats obtenus par la technique de Tunel, suggérant qu'ils sont dénués d'effets pro ou anti-apoptotiques dans le cartilage arthrosique.

Nous avons également montré que l'expression de deux gènes précoces de la réaction inflammatoire, iNOS et COX-2, était augmentée dans le cartilage au cours de la phase précoce de l'arthrose (J10) et que cette expression diminuait avec le temps pour revenir à des taux de base à J20. Ces résultats sont cohérents avec l'expression de iNOS et de COX-2 dans le cartilage arthrosique humain (Amin et coll, 1997) et pourraient avoir une signification physiopathologique puisque, parmi les mécanismes de l'apoptose, un rôle majeur a été attribué au NO. Plusieurs publications ont souligné l'implication de la cascade des caspases (Thornberry et Lazebnik, 1998) et son lien avec la production excessive de NO dans les genoux arthrosiques et plus particulièrement par les chondrocytes (Stadler et coll, 1991 ; Amin et coll, 1995). Le mécanisme exact par lequel le NO induit l'apoptose chondrocytaire, reste à élucider. Plusieurs hypothèses ont été envisagées, comme une action directe sur l'ADN, la génération de peroxy-nitrite, ou l'inactivation d'enzymes anti-oxydantes (Nguyen et coll, 1992 ; Lin et coll, 1995 ; Dobashi et coll, 1997 ; Asahi et coll, 1995). De plus, des études récentes ont montré que, dans des chondrocytes arthrosiques, le NO est un médiateur de l'apoptose par l'intermédiaire de l'induction de l'expression du gène de COX-2, et l'augmentation consécutive de la production des PGE₂ endogènes (Notoya et coll, 2000). Le

mécanisme exact par lequel les PGE₂ sont impliquées dans l'apoptose chondrocytaire est en cours d'exploration, mais une étude a montré qu'elles agiraient par un mécanisme direct (Miwa et coll, 2000).

Dans notre étude, les AINS diminuent l'expression de iNOS et de COX-2 de façon considérable, surtout au stade précoce (J10). Cette inhibition est marquée dans les zones profondes du cartilage et pourrait suggérer l'intervention de ces deux voies enzymatiques dans les modifications survenant dans la zone calcifiée du cartilage et l'os sous-chondral, au cours de l'arthrose au MIA (entre J10 et J15). La contribution de COX-2 a été suggérée dans la tumorigenèse, qu'il s'agisse de cellules recto-coliques (Taketo et coll, 1998) ou de cellules épithéliales (Liu et coll, 2001). Il était donc légitime de supposer que l'inhibition de COX-2 pourrait affecter la survie chondrocytaire. Cependant, nos résultats ne soutiennent pas cette hypothèse et semblent confirmer l'existence d'une spécificité tissulaire déterminante pour les effets des AINS sur l'apoptose. Ainsi, ils peuvent être pro-apoptotiques dans le cas de cellules cancéreuses, notamment colorectales, où les prostaglandines ont des propriétés anti-apoptotiques (Janne et Mayer, 2000 ; Steinbach et coll, 2000 ; Prescott, 2000). En revanche, ils seraient anti-apoptotiques dans les neurones (Tocco et coll, 1997) voire même dans des chondrocytes immortalisés stimulés par la staurosporine (Mukherjee et coll, 2001). Cette variabilité d'effet pourrait traduire la vitesse de renouvellement différente de ces tissus, avec une induction de l'apoptose limitée aux tissus à forte prolifération cellulaire.

Toutefois, la diminution d'expression des enzymes iNOS et COX-2 sous l'effet des AINS reste inexpliquée dans la mesure où ces molécules sont d'avantage des inhibiteurs enzymatiques que des inhibiteurs transcriptionnels, même si aucune modulation de la production de NO par les AINS n'a été mise en évidence dans les chondrocytes en culture (Nédélec et coll, 2001). Il faut cependant noter que des effets indépendants de l'inhibition des COXs ont été décrits pour les AINS. Ainsi, les AINS pourraient diminuer certaines activités transcriptionnelles, notamment la voie de NF-κB, conduisant à une réduction de certaines signalisations intra-cellulaires, y compris celles conduisant à l'induction de COX-2 et iNOS. En effet, les facteurs de transcription concernés (Tegeger et coll, 2001 ; Saunders et coll, 2001) possèdent des éléments de réponse dans les promoteurs de COX-2 (Hla et coll, 1999) et iNOS (Kwon et coll, 1998). Pour COX-2, on ne peut cependant pas exclure un mécanisme dépendant des COXs puisque la diminution de l'expression de COX-2 pourrait être causée par l'augmentation de l'instabilité de son ARNm secondaire à la réduction de la production de PGE₂ (Faour et coll, 2001).

Dans le modèle d'arthrose induite par section ligamentaire chez le chien, les expériences ont été réalisées à 8 semaines, c'est-à-dire à un stade d'arthrose déclarée. En effet, des lésions modérées du cartilage sont généralement observées au niveau des plateaux tibiaux et des condyles fémoraux dans ce modèle, même si ces lésions sont légèrement plus sévères au niveau des plateaux (Jovanovic et coll, 2001). Par ailleurs, la présence d'ostéophytes est observée sur les condyles fémoraux. Des expériences précédentes ont montré qu'à ce stade d'évolution du modèle, le ML-3000 était capable de réduire, à dose thérapeutique, la sévérité des lésions arthrosiques, tant sur le score macroscopique que sur les lésions histologiques (Pelletier et coll, 2000 ; Jovanovic et coll, 2001).

Nous avons montré que, dans ce modèle, 30% des chondrocytes étaient apoptotiques dans les zones superficielles du cartilage. Ceci est cohérent avec la localisation préférentielle de l'apoptose en surface et avec le niveau d'apoptose rapporté par ailleurs dans ce modèle (Pelletier et coll, 1999). Ces résultats sont également proches du pourcentage de cellules apoptotiques observées rapporté dans le modèle de section ligamentaire chez le lapin (Hashimoto et coll, 1998), même s'il excède largement le pourcentage d'apoptose observé dans le cartilage arthrosique humain (Hashimoto et coll, 1998). Parmi les explications possibles, en dehors des spécificités d'espèce, il faut souligner que les modèles sont généralement réalisés sur des animaux jeunes et que les prélèvements humains correspondent le plus souvent aux stades ultimes de la maladie. D'autre part, contrairement à ce que nous avons constaté avec le modèle au MIA, il existe une bonne corrélation entre les résultats obtenus par la réaction de Tunel et par la détection de la caspase-3 active, ce qui confirme l'hypothèse d'une certaine cytotoxicité du MIA.

Dans nos conditions expérimentales, le ML-3000 diminue efficacement l'apoptose chondrocytaire *in vivo* que ce soit dans les plateaux tibiaux ou les condyles fémoraux, des chiens arthrosiques. Cet effet protecteur a été observé dans les zones périlésionnelles, et est étroitement associé à l'inhibition de la forme active de la caspase-3, mettant ainsi en évidence le mécanisme par lequel le traitement serait capable de réduire l'apoptose dans les chondrocytes. Les résultats obtenus dans cette étude apportent de nouveaux éléments sur les mécanismes potentiels par lesquels cette molécule peut exercer ses effets chondroprotecteurs. En effet, une étude réalisée dans ce modèle d'arthrose expérimentale chez le chien, a montré qu'un agent capable de protéger contre la progression des lésions était aussi capable de réduire l'apoptose chondrocytaire (Takahashi et coll, 2000). L'intérêt de l'utilisation de ces molécules ayant des potentialités anti-apoptotiques dans le traitement clinique de l'arthrose reste cependant sujet à caution, dans la mesure où l'administration de ces molécules pourrait augmenter le risque de transformations malignes. Ceci est conforté par le fait que ces molécules qui induisent l'apoptose dans les cellules intestinales sont également capables de réduire l'incidence de certains cancers du colon (Janne et Mayer, 2000 ; Steinbach et coll, 2000). Malgré les spécificités cellulaires de la régulation du processus apoptotique évoquées précédemment, ceci souligne la nécessité de trouver des molécules capables d'inhiber l'apoptose dans les articulations avant d'envisager leur utilisation dans l'arthrose. Les mécanismes par lesquels le ML-3000 réduit l'activation de la caspase-3 demeurent inconnus. En effet, plusieurs études ont montré une participation contradictoire des LOXs dans l'apoptose. Ainsi, elles auraient un rôle facilitateur de l'apoptose dans les fibroblastes ou les cellules de cancer colorectal (Takano et coll, 2001 ; Gu et coll, 2001 ; Shureiqi et coll, 2000). En revanche, un rôle anti-apoptotique a été suggéré dans d'autres cellules cancéreuses (Ding et coll, 2001 ; Romano et coll, 2001 ; Wong et coll, 2001 ; Avis et coll, 2001). Ceci suggère, comme nous l'avons évoqué pour COX-2, que les LOXs, et par conséquent leur inhibition, pourraient avoir une sélectivité tissulaire vis-à-vis du processus apoptotique.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé une augmentation de l'expression de iNOS et de COX-2 dans le cartilage, ce qui est cohérent avec leur expression dans l'arthrose humaine (Amin et coll, 1997). Contrairement à l'expression transitoire que nous avons pu observer dans le modèle au MIA, ces protéines sont détectées à des stades plus

tardifs du processus arthrosique induit par la section ligamentaire (8 semaines). Ceci confirme indirectement que la composante inflammatoire est importante dans ce modèle (Pelletier et coll, 2000 et 2001). Le ML-3000 inhibe de façon significative l'expression de iNOS et de COX-2, ce qui suggère qu'il pourrait diminuer l'apoptose chondrocytaire au cours de l'arthrose en inhibant la production des métabolites qu'elles produisent. En effet, le NO et les PGE₂ ont été identifiés comme des activateurs de la cascade des caspases (Pelletier et coll, 2000). Ces résultats sont similaires à ceux observés dans le même modèle avec un inhibiteur sélectif de iNOS, la L-NIL (Pelletier et coll, 1999 et 2000) et semblent indiquer que l'inhibition COX/5-LOX serait associée à la diminution de nombreux facteurs procataboliques pour le cartilage. Un effet non-spécifique semble peu probable en raison des posologies thérapeutiques utilisées, même s'il ne peut pas être totalement exclu. En revanche, plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'effet inhibiteur du ML-3000 sur iNOS et COX-2. Tout d'abord, cette molécule est capable de réduire la synthèse d'IL-1 β par la synoviale dans ce modèle (Jovanovic et coll, 2001). Cet effet pourrait être lié à la capacité du ML-3000 d'inhiber l'activité de la 5-LOX et donc la synthèse de LTB₄ (Rainsford et coll, 1996). En effet, plusieurs travaux ont montré que le LTB₄ était capable de stimuler la synthèse d'IL-1 β , que ce soit dans des synoviocytes (Kageyama et coll, 1994) ou des monocytes (Tatsuno et coll, 1990 ; Rola-Pleszczynski et Lemaire, 1985) humains. D'autre part, des études récentes ont montré l'existence de boucles d'autorégulation, impliquant les MAP kinases, entre les voies inductibles de la NOS et de la COX qui pourrait apporter des éléments supplémentaires à la compréhension du mécanisme d'action du ML-3000. Ainsi, le niveau d'expression de COX-2 est augmenté par le NO dans le cartilage arthrosique et les PGE₂ entretiennent cette expression. Réciproquement, le niveau d'expression de iNOS est entretenu par le NO et les PGE₂ stimulent cette induction d'expression (Pelletier et coll, 2001). Par conséquent, en inhibant la synthèse des PGE₂, le ML-3000, pourrait diminuer indirectement l'expression de iNOS et de COX-2. Enfin, des travaux récents ont montré que le LTB₄ pouvait induire l'expression de COX-2 dans des explants de synoviale arthrosique humaine (He et coll, 2001), ce qui suggère que l'inhibition de la 5-LOX par le ML-3000 pourrait rendre compte de la réduction de l'expression de COX-2 dans les chondrocytes OA.

Conclusions et perspectives

La première partie de l'étude nous a permis de comparer des AINS ayant des profils de sélectivité différents vis-à-vis des isoenzymes de COX dans des modèles d'arthrite, reproduisant une évolution aiguë ou chronique, ayant des mécanismes physiopathologiques différents et associés à une réaction inflammatoire locale ou systémique.

Cette étude nous a permis dans un premier temps, de confirmer l'équivalence d'efficacité des inhibiteurs réputés préférentiel (MLX) ou sélectif (CXB) de COX-2 avec les inhibiteurs non sélectifs (AINS classiques) quel que soit le modèle considéré. Cependant, le suivi longitudinal par biotélémétrie a permis de montrer que ces « nouveaux inhibiteurs » avaient un délai d'action plus long que l'AINS comparateur puisqu'ils étaient moins efficaces sur les symptômes associés à la réaction inflammatoire aiguë.

L'étude comparée de l'inhibition des COXs par ces molécules dans le compartiment circulant (COX-1 plaquettaire) ou les tissus cibles (COX-1 gastrique, COX-2 patte inflammatoire), a permis de confirmer que : i) tous les AINS inhibent COX-2 au site inflammatoire ; ii) seul un AINS réputé sélectif de COX-2 est dénué d'effet inhibiteur sur l'activité COX-1 plaquettaire et gastrique ; iii) une inhibition préférentielle ou sélective de COX-2 ne peut être mise en évidence que tardivement en utilisant les indices de sélectivité tissulaire ; iv) il existe une diminution progressive du pouvoir inhibiteur des AINS classiques sur la biosynthèse gastrique des PGE₂. Ces résultats nous ont permis de démontrer l'intérêt d'une évaluation de l'inhibition des COXs dans les différents compartiments de l'organisme, puisque l'inhibition de la synthèse de TxB₂ par la COX-1 plaquettaire permet de discriminer précocément un inhibiteur sélectif de COX-2 et que l'inhibition de la synthèse de PGE₂ au site inflammatoire permet de discriminer tardivement un inhibiteur préférentiel de COX-2. D'autre part, bien que nous ayons établi des indices de sélectivité *in vivo* dans des conditions proches de l'utilisation des AINS en clinique (dose efficace, animal malade, traitement prolongé), nous avons montré que leur pertinence était néanmoins sujette à leur variabilité dans le temps.

Par ailleurs, nous avons montré que des inhibiteurs préférentiel ou sélectif de COX-2 ne perturbaient pas le métabolisme du cartilage (biosynthèse des protéoglycanes) *in vivo*. Cependant, nous n'avons considéré qu'un des aspects du métabolisme du cartilage de sorte que des études complémentaires seront nécessaires pour évaluer les conséquences d'une inhibition sélective de COX-2 sur le cartilage arthritique dans d'autres sites anatomiques (synoviale, zones portantes du cartilage) et sur d'autres aspects fonctionnels. En effet, compte tenu de la capacité de certains AINS classiques de moduler les activités métalloprotéasiques (Ratcliffe et coll, 1993) et du rôle de ces enzymes dans la dégradation du cartilage au cours de la polyarthrite rhumatoïde (Roux Lombard et coll, 2001), il serait important d'étudier l'impact pharmacologique des inhibiteurs préférentiels ou sélectifs de COX-2 sur ce paramètre. D'autre part, avant de pouvoir conclure à la chondroneutralité de ces molécules, il sera nécessaire d'évaluer leurs effets sur la survie chondrocytaire et l'organisation du réseau collagénique.

Dans la seconde partie de l'étude, nous avons mis en évidence une augmentation du processus apoptotique dans deux modèles d'arthrose, ayant une composante inflammatoire

variable. Nous avons d'ailleurs, confirmé indirectement cette différence entre les deux modèles puisque la contribution des voies inductibles de la COX et de la NOS semble plus importante dans le modèle d'arthrose induit par section ligamentaire.

L'étude comparée du rofécoxib, inhibiteur sélectif de COX-2, et du naproxène, AINS comparateur, dans le modèle au MIA nous a permis de montrer que : i) les AINS n'ont pas d'effet aggravant sur la sévérité des lésions, ni d'effet pro-apoptotique, confirmant la sélectivité tissulaire des AINS vis-à-vis du processus apoptotique ; ii) les AINS sont sans effet sur l'augmentation transitoire d'expression de iNOS et de COX-2 ; iii) une posologie excessive de rofécoxib (deux fois la DE_{50} dans l'inflammation) ne provoque pas d'effet délétère sur le cartilage ; iv) les différences observées avec deux techniques d'évaluation de la mort cellulaire par apoptose sont compatibles avec la mort cellulaire par nécrose dans le modèle au MIA. Cette étude apporte des éléments importants concernant les effets des inhibiteurs sélectifs de COX-2 sur le cartilage arthrosique. Bien que cet effet chondroneutre soit cohérent avec les premières observations cliniques (Tindall et coll, 2000), il sera nécessaire, avant de conclure définitivement à la chondroneutralité du rofécoxib, d'explorer ses effets sur d'autres aspects du cartilage.

Les résultats obtenus dans le modèle d'arthrose par section ligamentaire chez le chien, montrent que : i) une inhibition mixte de la cyclooxygénase et de la 5-lipoxygénase procure une chondroprotection expérimentale ; ii) cet effet est associé à une réduction nette du phénomène apoptotique et à la réduction de l'expression de deux gènes de la réaction inflammatoire. Ces résultats laissent envisager des perspectives intéressantes vis-à-vis de la contribution de la 5-LOX dans les lésions du cartilage articulaire au cours de l'arthrose, dans la mesure où notre travail confirme des travaux ayant montré une inhibition des cytokines pro-inflammatoires par cette molécule.

Nos résultats apportent des éléments sur les effets de nouvelles molécules sur le cartilage articulaire dans différents modèles d'arthropathie. Ces molécules ont une tolérance digestive améliorée. Cependant, il serait intéressant de compléter nos travaux par l'étude de leurs effets sur d'autres aspects du métabolisme du cartilage. De même, il paraît important de vérifier la pertinence de l'hypothèse de chondroneutralité à des stades plus sévères de la maladie arthrosique.

Nous avons également envisager, pour ces molécules, des effets indépendants de l'inhibition des COXs (Tegeder et coll, 2001). Ces effets pourraient être vérifiés par des études de signalisation intra-cellulaire dans le cartilage arthrosique

De plus, les effets chondroneutres des AINS n'ont jamais été observés que dans des modèles expérimentaux. Il serait donc intéressant d'étudier le processus arthrosique expérimental, afin de déterminer la contribution des cytokines et de la membrane synoviale. Ceci paraît d'autant plus important dans le cas de l'inhibition mixte COX/5-LOX, dans la mesure où il a été montré que le LTB_4 pouvait induire la production d'IL-1.

Le remaniement osseux est un autre aspect du processus arthrosique qui pourrait faire l'objet d'investigation. En effet, les PGs interviennent dans ce phénomène et COX-2 contribue de façon variable à la différenciation des ostéoblastes en ostéoclastes. Il serait donc intéressant d'étudier les conséquences de l'inhibition sélective de COX-2 sur l'os.

L'inhibition mixte COX/5-LOX paraît favorable pour le cartilage. Il faudrait par la suite, vérifier si ses effets sont bien directement liés à l'inhibition de la synthèse du LTB₄.

Si l'absence d'effet délétère des inhibiteurs sélectifs de COX-2 sur le cartilage pathologique est confirmé, il sera par ailleurs important de la confirmer à des stades ultérieures, compte tenu de la découverte récente de la synthèse de PGs potentiellement anti-inflammatoire dans les phases de rémissions. Il serait également intéressant d'étudier l'expression des différentes PGS dans le cartilage au cours des différentes pathologies articulaires, afin d'établir un couplage entre les isoformes de COX et les différentes enzymes de la synthèse des PGs et d'envisager d'autres cibles.

Enfin, si les risques cardio-vasculaires des inhibiteurs sélectifs de COX-2 sont confirmés, il sera légitime d'envisager d'autres alternatives thérapeutiques, dont les nouveaux NO-AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2 et d'en étudier les effets au niveau du cartilage.

Références bibliographiques

A

- Abrahamsohn PA, Zorn TM.** Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 1993 Sep 1 **266:6** 603-28.
- Abramovitz M, Wong E, Cox ME, Richardson CD, Li C, Vickers PJ.** 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem* 1993 Jul 1 **215:1** 105-11.
- Abramson SB, Weissmann G.** The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum* 1989 Jan **32:1** 1-9.
- Ackerman RC, Murdoch WJ.** Prostaglandin-induced apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Prostaglandins* 1993 May **45:5** 475-85.
- ACR Guidelines.** American College of Rheumatology subcommittee on OA guidelines, *Arthritis Rheum*, 2000 **43** 1905-15
- Adie EJ, Mullaney I, McKenzie FR, Milligan G.** Concurrent down-regulation of IP prostanoid receptors and the alpha-subunit of the stimulatory guanine-nucleotide-binding protein (Gs) during prolonged exposure of neuroblastoma x glioma cells to prostanoid agonists. Quantification and functional implications. *Biochem J* 1992 Jul 15 **285 (Pt 2)**: 529-36.
- Agrawal NG, Porras AG, Matthews CZ, Woolf EJ, Miller JL, Mukhopadhyay S, Neu DC, Gottesdiener KM.** Dose proportionality of oral etoricoxib, a highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2001 Oct **41:10** 1106-10.
- Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL.** Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 Jul **279:1** G238-44.
- Allgayer H, Deschryver K, Stenson WF.** Treatment with 16,16'-dimethyl prostaglandin E2 before and after induction of colitis with trinitrobenzenesulfonic acid in rats decreases inflammation. *Gastroenterology.* 1989 May **96:5 Pt 1** 1290-300.
- Amin AR, Abramson SB.** The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1998 May **10:3** 263-8.
- Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, Stuchin SA, Abramson SB.** The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 1995 Dec 1 **182:6** 2097-102.
- An S, Yang J, So SW, Zeng L, Goetzl EJ.** Isoforms of the EP3 subtype of human prostaglandin E2 receptor transduce both intracellular calcium and cAMP signals. *Biochemistry* 1994 Dec 6 **33:48** 14496-502.
- Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA.** Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 1996 Jun 1 **97:11** 2672-9.
- Anthony J.F.; Gelbart, William M.; Miller, Jeffrey H.; Lewontin, Richard C.** In Introduction to Genetic Analysis. 7th ed. Griffiths, New York: W H Freeman & Co; c1999.
- Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T.** Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 1994 Sep 15 **302 (Pt 3)**: 723-7.
- Appleton I, Tomlinson A, Mitchell JA, Willoughby DA.** Distribution of cyclooxygenase isoforms in murine chronic granulomatous inflammation. Implications for future anti-inflammatory therapy. *J Pathol* 1995 Aug **176:4** 413-20.
- Arbabi S, Rosengart MR, Garcia I, Jelacic S, Maier RV.** Epithelial cyclooxygenase-2 expression: a model for pathogenesis of colon cancer. *J Surg Res.* 2001 May 1 **97:1** 60-4.
- Armstrong CP, Blower AL.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs and life threatening complications of peptic ulceration. *Gut* 1987 May **28:5** 527-32.
- Asahi M, Fujii J, Takao T, Kuzuya T, Hori M, Shimonishi Y, Taniguchi N.** The oxidation of selenocysteine is involved in the inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide donor. *J Biol Chem.* 1997 Aug 1 **272:31** 19152-7.

Asako H, Kubes P, Wallace J, Gaginella T, Wolf RE, Granger DN. Indomethacin-induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxygenase products. *Am J Physiol* 1992 May **262:5 Pt 1** G903-8.

Austin SC, Funk CD. Insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1999 Nov **58:5-6** 231-52.

Avis I, Hong SH, Martinez A, Moody T, Choi YH, Trepel J, Das R, Jett M, Mulshine JL. Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *FASEB J* 2001 **15:11** 2007-9.

B

Bae SH, Jung ES, Park YM, Kim BS, Kim BK, Kim DG, Ryu WS. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in hepatocellular carcinoma and growth inhibition of hepatoma cell lines by a COX-2 inhibitor, NS-398. *Clin Cancer Res* 2001 May **7:5** 1410-8.

Balsinde J, Shinohara H, Lefkowitz LJ, Johnson CA, Balboa MA, Dennis EA. Group V phospholipase A(2)-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. *J Biol Chem* 1999 Sep 10 **274:37** 25967-70.

Bambai B, Kulmacz RJ. Prostaglandin H synthase. Effects of peroxidase cosubstrates on cyclooxygenase velocity. *J Biol Chem* 2000 Sep 8 **275:36** 27608-14.

Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 1996 Jun **17:3** 245-61.

Barnes CJ, Hamby-Mason RL, Hardman WE, Cameron IL, Speeg KV, Lee M. Effect of aspirin on prostaglandin E2 formation and transforming growth factor alpha expression in human rectal mucosa from individuals with a history of adenomatous polyps of the colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Apr **8:4 Pt 1** 311-5.

Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* 1994 Nov 16 **1209:1** 130-9.

Bassleer C, Henrotin Y, Franchimont P. Effects of sodium naproxen on differentiated human chondrocytes cultivated in clusters. *Clin Rheumatol.* 1992 Mar **11:1** 60-5.

Bassleer C, Magotteaux J, Geenen V, Malaise M. Effects of meloxicam compared to acetylsalicylic acid in human articular chondrocytes. *Pharmacology* 1997 Jan **54:1** 49-56.

Belch JJ. Eicosanoids and rheumatology: inflammatory and vascular aspects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1989 Jun **36:4** 219-34.

Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol* 1988 Dec **15:12** 1833-40.

Bellamy N. Outcome measurement in osteoarthritis clinical trials. *J Rheumatol Suppl* 1995 Feb **43:** 49-51.

Belmont HM, Levartovsky D, Goel A, Amin A, Giorno R, Rediske J, Skovron ML, Abramson SB. Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997 Oct **40:10** 1810-6.

Ben Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* 1995 Sep 18 **372:1** 83-7.

Bennett WM, Henrich WL, Stoff JS. The renal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: summary and recommendations. *Am J Kidney Dis* 1996 Jul **28:1 Suppl 1** S56-62.

Bentley G. Experimental osteoarthritis (p.259). In: Normal and osteoarthritic articular cartilage. Londres, Pub. Institute of orthopaedics, Ali, Elves, Leaback, 1974.

Bergstrom S, Danielsson H, Samuelsson B. The enzymatic formation of PGE₂ from arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* 1964 **90:** 207-10.

Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res.* 2001 Dec **44:6** 437-450.

- Beuckmann CT, Fujimori K, Urade Y, Hayaishi O.** Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochem Res* 2000 May **25**:5 733-8.
- Bezzine S, Koduri RS, Valentin E, Murakami M, Kudo I, Ghomashchi F, Sadilek M, Lambeau G, Gelb MH.** Exogenously added human group X secreted phospholipase A(2) but not the group IB, IIA, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells. *J Biol Chem* 2000 Feb 4 **275** :5 3179-91.
- Bhattacharyya DK, Lecomte M, Rieke CJ, Garavito M, Smith WL.** Involvement of arginine 120, glutamate 524, and tyrosine 355 in the binding of arachidonate and 2-phenylpropionic acid inhibitors to the cyclooxygenase active site of ovine prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *J Biol Chem.* 1996 Jan 26 **271**:4 2179-84.
- Bingham CO 3rd, Murakami M, Fujishima H, Hunt JE, Austen KF, Arm JP.** A heparin-sensitive phospholipase A2 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 are functionally linked in the delayed phase of prostaglandin D2 generation in mouse bone marrow-derived mast cells. *J Biol Chem* 1996 Oct 18 **271**:42 25936-44.
- Bjarnason I, Williams P, So A, Zanelli GD, Levi AJ, Gumpel JM, Peters TJ, Ansell B.** Intestinal permeability and inflammation in rheumatoid arthritis: effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 1984 **2** 1171-4.
- Bjarnason I, Zanelli G, Prouse P, Smethurst P, Smith T, Levi S, Gumpel MJ, Levi AJ.** Blood and protein loss via small-intestinal inflammation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 1987 Sep 26 **2**:8561 711-4.
- Bjelle A, Eronen I.** The in vitro effect of six NSAIDs on the glycosaminoglycan metabolism of rabbit chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol* 1991 Jul-Aug **9**:4 369-74.
- Blanco FJ, Guitian R, Moreno J, de Toro FJ, Galdo F.** Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1999 Jun **26**:6 1366-73.
- Blanco FJ, Guitian R, Vazquez Martul E, de Toro FJ, Galdo F.** Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998 Feb **41**:2 284-9.
- Blanco FJ, Lotz M.** IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. *Exp Cell Res* 1995 May **218**:1 319-25.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M.** Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995 Jan **146**:1 75-85.
- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ, CollectiveName VIGOR Study Group CollectiveName.** Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000 Nov 23 **343**:21 1520-8, 2 p following 1528.
- Bonewald LF, Flynn M, Qiao M, Dallas MR, Mundy GR, Boyce BF.** Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness. *Adv Exp Med Biol* 1997 **433**: 299-302.
- Bonnet C, Bertin P, Cook Moreau J, Chable Rabinovitch H, Treves R, Rigaud M.** Lipoxygenase products and expression of 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in human cultured synovial cells. *Prostaglandins* 1995 Sep **50**:3 127-35.
- Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR, O'Leary E, Li E, Moskowitz MA, Sapirstein A.** Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature.* 1997 Dec 11 **390**: 6660 622-5.
- Boulos C, Jiang H, Balazy M.** Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 Apr **293**:1 222-9.
- Boyan BD, Lohmann CH, Sisk M, Liu Y, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z.** Both cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mediate osteoblast response to titanium surface roughness. *J Biomed Mater Res* 2001 Jun 5 **55**:3 350-9.
- Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF.** Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* 1997 Sep 15 **186**:6 909-20.
- Brain SD, Williams TJ.** Leukotrienes and inflammation. *Pharmacol Ther* 1990 **46**:1 57-66.

- Brandt KD, Pamoski MJ.** Effects of salicylates and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on articular cartilage. *Am J Med.* 1984 Jul 13 **77:1A** 65-9.
- Brandt KD.** Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on chondrocyte metabolism in vitro and in vivo. *Am J Med* 1987 Nov 20 **83:5A** 29-34.
- Brandt KD.** Nonsteroidal antiinflammatory drugs and articular cartilage. *J Rheumatol* 1987 May **14 Spec No:** 132-3.
- Brater DC, Harris C, Redfern JS, Gertz BJ.** Renal effects of cox-2-selective inhibitors. *Am J Nephrol* 2001 Jan-Feb **21:1** 1-15.
- Brater DC.** Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: focus on cyclooxygenase-2-selective inhibition. *Am J Med* 1999 Dec 13 **107:6A** 65S-70S; discussion 70S-71S.
- Bredt DS, Snyder SH.** Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994 **63:** 175-95.
- Breyer MD, Jacobson HR, Breyer RM.** Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J Am Soc Nephrol* 1996 Jan 7:1 8-17.
- Breyer MD, Zhang Y, Guan YF, Hao CM, Hebert RL, Breyer RM.** Regulation of renal function by prostaglandin E receptors. *Kidney Int Suppl* 1998 Sep **67:** S88-94.
- Brideau C, Kargman S, Liu S, Dallob AL, Ehrich EW, Rodger IW, Chan CC.** A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm Res* 1996 Feb **45:2** 68-74.
- Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M.** Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J Biol Chem* 1999 Apr 23 **274:17** 11660-6.
- Brooks P, Emery P, Evans JF, Fenner H, Hawkey CJ, Patrono C, Smolen J, Breedveld F, Day R, Dougados M, Ehrich EW, Gijon Banos J, Kvien TK, Van Rijswijk MH, Warner T, Zeidler H.** Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology (Oxford)* 1999 Aug **38:8** 779-88.
- Brown DM, Warner GL, Ales Martinez JE, Scott DW, Phipps RP.** Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1992 Jun **63:3** 221-9.
- Burch RM, Axelrod J.** Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Sep **84:18** 6374-8.
- Buttgereit F, Burmester GR, Simon LS.** Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med* 2001 Feb 19 **110 Suppl 3A:** 13S-9S.

C

- Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT.** Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1995 Apr **9:4** 401-12.
- Callejas NA, Castrillo A, Bosca L, Martin Sanz P.** Inhibition of prostaglandin synthesis up-regulates cyclooxygenase-2 induced by lipopolysaccharide and peroxisomal proliferators. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Mar **288:3** 1235-41.
- Campbell IK, Piccoli DS, Hamilton JA.** Stimulation of human chondrocyte prostaglandin E2 production by recombinant human interleukin-1 and tumour necrosis factor. *Biochim Biophys Acta* 1990 Mar 9 **1051:3** 310-8.
- Cannon GW, Caldwell JR, Holt P, McLean B, Seidenberg B, Bolognese J, Ehrich E, Mukhopadhyay S, Daniels B.** Rofecoxib, a specific inhibitor of cyclooxygenase 2, with clinical efficacy comparable with that of diclofenac sodium: results of a one-year, randomized, clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee and hip. Rofecoxib Phase III Protocol 035 Study Group. *Arthritis Rheum* 2000 May **43:5** 978-87.
- Cao L, Yang BB.** Chondrocyte apoptosis induced by aggrecan G1 domain as a result of decreased cell adhesion. *Exp Cell Res.* 1999 Feb 1 **246:2** 527-37.
- Capdevila JH, Morrow JD, Belosludtsev YY, Beauchamp DR, DuBois RN, Falck JR.** The catalytic outcomes of the constitutive and the mitogen inducible isoforms of prostaglandin H2 synthase are markedly affected by glutathione and glutathione peroxidase(s). *Biochemistry* 1995 Mar 14 **34:10** 3325-37.

- Carabaza A, Cabre F, Rotllan E, Gomez M, Gutierrez M, Garcia ML, Mauleon D.** Stereoselective inhibition of inducible cyclooxygenase by chiral nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Pharmacol* 1996 Jun **36**:6 505-12.
- Carson JL, Strom BL, Morse ML, West SL, Soper KA, Stolley PD, Jones JK.** The relative gastrointestinal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arch Intern Med.* 1987 Jun **147**:6 1054-9.
- Castrillo A, Diaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martin-Sanz P, Bosca L.** Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* 2000 Mar **20**:5 1692-8.
- Catella Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, FitzGerald GA.** Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 May **289**:2 735-41.
- Celotti F, Laufer S.** Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol Res.* 2001 May **43**:5 429-36.
- Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK.** Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol.* 1996 Apr **16**:2 107-22.
- Chan CC, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans J, Ford Hutchinson AW, Forrest MJ, Gauthier JY, Gordon R, Gresser M, Guay J, Kargman S, Kennedy B, Leblanc Y, Leger S, Mancini J, O'Neill GP, Ouellet M, Patrick D, Percival MD, Perrier H, Prasit P, Rodger I.** Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Aug **290**:2 551-60.
- Chan CC, Boyce S, Brideau C, Ford Hutchinson AW, Gordon R, Guay D, Hill RG, Li CS, Mancini J, Penneton M.** Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. *J Pharmacol Exp Ther* 1995 Sep **274**:3 1531-7.
- Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ.** Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999 Mar 1 **59**:5 991-4.
- Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW.** Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jan 20 **95**:2 681-6.
- Chang DJ, Fricke JR, Bird SR, Bohidar NR, Dobbins TW, Geba GP.** Rofecoxib versus codeine/acetaminophen in postoperative dental pain: a double-blind, randomized, placebo- and active comparator-controlled clinical trial. *Clin Ther.* 2001 Sep **23**:9 1446-55.
- Chapple KS, Cartwright EJ, Hawcroft G, Tisbury A, Bonifer C, Scott N, Windsor AC, Guillou PJ, Markham AF, Coletta PL, Hull MA.** Localization of cyclooxygenase-2 in human sporadic colorectal adenomas. *Am J Pathol* 2000 Feb **156**:2 545-53.
- Chaudry AA, Wahle KW, McClinton S, Moffat LE.** Arachidonic acid metabolism in benign and malignant prostatic tissue in vitro: effects of fatty acids and cyclooxygenase inhibitors. *Int J Cancer* 1994 Apr 15 **57**:2 176-80.
- Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM.** PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001 Jan **7**:1 48-52.
- Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA.** Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 1994 Aug **135**:2 798-800.
- Chen QR, Miyaura C, Higashi S, Murakami M, Kudo I, Saito S, Hiraide T, Shibasaki Y, Suda T.** Activation of cytosolic phospholipase A2 by platelet-derived growth factor is essential for cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 synthesis in mouse osteoblasts cultured with interleukin-1. *J Biol Chem* 1997 Feb 28 **272**:9 5952-8.
- Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, McKanna JA, Harris RC.** Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 1999 Apr **103**:7 953-61.

- Chin JE, Lin YA.** Effects of recombinant human interleukin-1 beta on rabbit articular chondrocytes. Stimulation of prostanoid release and inhibition of cell growth. *Arthritis Rheum* 1988 Oct **31:10** 1290-6.
- Chulada PC, Thompson MB, Mahler JF, Doyle CM, Gaul BW, Lee C, Tiano HF, Morham SG, Smithies O, Langenbach R.** Genetic disruption of PtgS-1, as well as PtgS-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res* 2000 Sep 1 **60:17** 4705-8.
- Cipolletta C, Jouzeau JY, Gegout-Pottie P, Presle N, Bordji K, Netter P, Terlain B.** Modulation of IL-1-induced cartilage injury by NO synthase inhibitors: a comparative study with rat chondrocytes and cartilage entities. *Br J Pharmacol* 1998 Aug **124:8** 1719-27.
- Cipollone F, Ganci A, Panara MR, Greco A, Cuccurullo F, Patrono C.** Effects of nabumetone on prostanoid biosynthesis in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995 Sep **58:3** 335-41.
- Cirino G.** Multiple controls of inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol.* 1998 **15:55(2)** 105-11.
- Clancy RM, Amin AR, Abramson SB.** The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998 Jul **41:7** 1141-51.
- Clive DM, Stoff JS.** Renal syndromes associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 1984 Mar 1 **310:9** 563-72.
- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S.** International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 1994 Jun **46:2** 205-29.
- Collier S, Ghosh P.** Comparison of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on proteoglycan synthesis by articular cartilage explant and chondrocyte monolayer cultures. *Biochem Pharmacol.* 1991 May 1 **41:9** 1375-84.
- Collins C, Evans RG, Ponsford F, Miller P, Elson CJ.** Chondro-osseous metaplasia, bone density and patellar cartilage proteoglycan content in the osteoarthritis of STR/ORT mice. *Osteoarthritis Cartilage.* 1994 Jun **2:2** 111-8.
- Colville Nash PR, Qureshi SS, Willis D, Willoughby DA.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J Immunol* 1998 Jul 15 **161:2** 978-84.
- Conte G, Cianciaruso B, De Nicola L, Sepe V, Romano G, Domenico R, Caglioti A, Fuiano G, Dal Canton A.** Inhibition of urea tubular reabsorption by PGE1 infusion in man. *Nephron* 1992 **60:1** 42-8.
- Copeland RA, Williams JM, Giannaras J, Nurnberg S, Covington M, Pinto D, Pick S, Trzaskos JM.** Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Nov 8 **91:23** 11202-6.
- Cournil C, Vial B, Gegout-Pottie P, Terlain B, Netter P, Gillet P, Abid A.** Hsp70 and Bcl-2 protect cultured chondrocytes against monoiodoacetate cytotoxicity. *Fund and Clin Pharmacol.* 2000 **14** 247.
- Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH, Hallden G, Kim GS, Bjeldanes LF, Firestone GL.** Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 1998 Feb 13 **273:7** 3838-47.
- Crew TE, Elder DJ, Paraskeva C.** A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate. *Carcinogenesis* 2000 Jan **21:1** 69-77.
- Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS, van de Putte LB.** Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum* 2000 Jan **43:1** 4-13.
- Crofford LJ, Oates JC, McCune WJ, Gupta S, Kaplan MJ, Catella Lawson F, Morrow JD, McDonagh KT, Schmaier AH.** Thrombosis in patients with connective tissue diseases treated with specific cyclooxygenase 2 inhibitors. A report of four cases. *Arthritis Rheum* 2000 Aug **43:8** 1891-6.
- Crofford LJ, Wilder RL, Ristimaki AP, Sano H, Remmers EF, Epps HR, Hla T.** Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 1994 Mar **93:3** 1095-101.

Cromlish WA, Kennedy BP. Selective inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 using intact insect cell assays. *Biochem Pharmacol.* 1996 Dec 13 **52:11** 1777-85.

Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998 May **104:5** 413-21.

Cullen L, Kelly L, Connor SO, Fitzgerald DJ. Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1998 Nov **287:2** 578-82.

D

Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects. *Eur J Med Chem* 2001 Feb **36:2** 109-26.

Dannhardt G, Laufer S. Structural approaches to explain the selectivity of COX-2 inhibitors: is there a common pharmacophore? *Curr Med Chem* 2000 Nov **7:11** 1101-12.

Davi G, Patrono C, Catalano I, Custro N, Giammarresi C, Ganci A, Cosentino F, Notarbartolo A. Inhibition of thromboxane biosynthesis and platelet function by indobufen in type II diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb* 1993 Sep **13:9** 1346-9.

Davies P, Bailey PJ, Goldenberg MM, Ford Hutchinson AW. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu Rev Immunol* 1984 **2:** 335-57.

Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC, Langenbach R. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. *Endocrinology* 1999 Jun **140:6** 2685-95.

Davis R, Brogden RN. Nimesulide. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 1994 Sep **48:3** 431-54.

Day R, Morrison B, Luza A, Castaneda O, Strusberg A, Nahir M, Helgetveit KB, Kress B, Daniels B, Bolognese J, Krupa D, Seidenberg B, Ehrich E. A randomized trial of the efficacy and tolerability of the COX-2 inhibitor rofecoxib vs ibuprofen in patients with osteoarthritis. Rofecoxib/Ibuprofen Comparator Study Group. *Arch Intern Med.* 2000 Jun 26 **160:12** 1781-7.

de Brum Fernandes AJ, Laporte S, Heroux M, Lora M, Patry C, Menard HA, Dumais R, Leduc R. Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Feb 15 **198:3** 955-60.

De Caterina R, Giannessi D, Bernini W, Gazzetti P, Michelassi C, L Abbate A, Donato L, Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Low-dose aspirin in patients recovering from myocardial infarction. Evidence for a selective inhibition of thromboxane-related platelet function. *Eur Heart J* 1985 May **6:5** 409-17.

de Meijer A, Vollaard H, de Metz M, Verbruggen B, Thomas C, Novakova I. Meloxicam, 15 mg/day, spares platelet function in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1999 Oct **66:4** 425-30.

Del Toro F, Sylvia VL, Schubkegel SR, Campos R, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Characterization of prostaglandin E(2) receptors and their role in 24,25-(OH)(2)D(3)-mediated effects on resting zone chondrocytes. *J Cell Physiol* 2000 Feb **182:2** 196-208.

Dennis EA. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* 1997 Jan **22:1** 1-2.

Depre M, Ehrich E, Van Hecken A, De Lepeleire I, Dallob A, Wong P, Porras A, Gertz BJ, De Schepper PJ. Pharmacokinetics, COX-2 specificity, and tolerability of supratherapeutic doses of rofecoxib in humans. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000 May **56:2** 167-74.

Dequeker J, Hawkey C, Kahan A, Steinbruck K, Alegre C, Baumelou E, Begaud B, Isomaki H, Littlejohn G, Mau J, Papazoglou S. Improvement in gastrointestinal tolerability of the selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor, meloxicam, compared with piroxicam: results of the Safety and Efficacy Large-scale Evaluation of COX-inhibiting Therapies (SELECT) trial in osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 1998 Sep **37:9** 946-51.

Desa FM, Chander CL, Moore AR, Howat DW, Corry DG, Willoughby DA. The effect of indomethacin on cartilage breakdown. *Agents Actions.* 1989 Jun **27:3-4** 485-7.

Despré A, Jambut-Absil AC, Javerliat M, Bruxeraud J. Les prostaglandines: utilisations thérapeutiques. *Actualités Pharmaceutiques* 1989 **264:** 35-40.

- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W.** The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996 Nov 7 **384:6604** 39-43.
- DeWitt DL, el Harith EA, Kraemer SA, Andrews MJ, Yao EF, Armstrong RL, Smith WL.** The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J Biol Chem* 1990 Mar 25 **265:9** 5192-8.
- DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* 1991 May 8 **1083:2** 121-34.
- Di Rosa M, Papadimitriou JM, Willoughby DA.** A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pathol* 1971 Dec **105:4** 239-56.
- DiBattista JA, Dore S, Morin N, Abribat T.** Prostaglandin E2 up-regulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression and synthesis in human articular chondrocytes by a c-AMP-independent pathway: role of calcium and protein kinase A and C. *J Cell Biochem* 1996 Dec 1 **63:3** 320-33.
- DiBattista JA, Fahmi H, He Y, Zhang M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP.** Differential regulation of interleukin-1 beta-induced cyclooxygenase-2 gene expression by nimesulide in human synovial fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol* 2001 **19:1 Suppl 22** S3-5.
- DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP.** Modulation of glucocorticoid receptor expression in human articular chondrocytes by cAMP and prostaglandins. *J Rheumatol Suppl* 1991 Feb **27:** 102-5.
- DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Fujimoto N, Obata K, Zafarullah M, Pelletier JP.** Prostaglandins E2 and E1 inhibit cytokine-induced metalloprotease expression in human synovial fibroblasts. Mediation by cyclic-AMP signalling pathway. *Lab Invest* 1994 Aug **71:2** 270-8.
- DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Morin N, Jolicœur FC, Pelletier JP.** Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in human synovial fibroblasts by prostaglandin E2: mediation by protein kinase A and role of interleukin-1. *Mol Cell Endocrinol* 1994 Jul **103:1-2** 139-48.
- Dietz R, Nastainczyk W, Ruf HH.** Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G2. *Eur J Biochem* 1988 Jan 15 **171:1-2** 321-8.
- Dimberg J, Samuelsson A, Hugander A, Soderkvist P.** Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer. *Gut* 1999 Nov **45:5** 730-2.
- Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM.** Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 1997 Feb 17 **185:4** 601-7.
- Ding XZ, Tong WG, Adrian TE.** 12-lipoxygenase metabolite 12(S)-HETE stimulates human pancreatic cancer cell proliferation via protein tyrosine phosphorylation and ERK activation. *Int J Cancer* 2001 **94:5** 630-6.
- Dingle JT, Parker M.** NSAID stimulation of human cartilage matrix synthesis. A study of the mechanism of action of aceclofenac. *Clin Drug Invest* 1997 **14** 353-62.
- Dingle JT.** Cartilage maintenance in osteoarthritis: interaction of cytokines, NSAID and prostaglandins in articular cartilage damage and repair. *J Rheumatol Suppl* 1991 Mar **28:** 30-7.
- Dingle JT.** The effects of NSAID on the matrix of human articular cartilages. *Z Rheumatol.* 1999 Jun **58:3** 125-9.
- Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, Miller DK.** Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature.* 1990 Jan 18 **343:6255** 282-4.
- Dobashi K, Pahan K, Chahal A, Singh I.** Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C6 glial cells. *J Neurochem.* 1997 May **68:5** 1896-903.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE.** Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998 Sep **12:12** 1063-73.
- Dworski R, Sheller JR.** Differential sensitivities of human blood monocytes and alveolar macrophages to the inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by interleukin-4. *Prostaglandins* 1997 Apr **53:4** 237-51.

E

- Eberhardt CE, Dubois RN. Eicosanoids and gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1995 **109** 285-301.
- Ehrich EW, Dallob A, De Lepeleire I, Van Hecken A, Riendeau D, Yuan W, Porras A, Wittreich J, Seibold JR, De Schepper P, Mehlich DR, Gertz BJ. Characterization of rofecoxib as a cyclooxygenase-2 isoform inhibitor and demonstration of analgesia in the dental pain model. *Clin Pharmacol Ther* 1999 Mar **65**:3 336-47.
- Ehrich EW, Schnitzer TJ, McIlwain H, Levy R, Wolfe F, Weisman M, Zeng Q, Morrison B, Bolognese J, Seidenberg B, Gertz BJ. Effect of specific COX-2 inhibition in osteoarthritis of the knee: a 6 week double blind, placebo controlled pilot study of rofecoxib. Rofecoxib Osteoarthritis Pilot Study Group. *J Rheumatol*. 1999 Nov **26**:11 2438-47.
- Eklund B, Carlson LA. Central and peripheral circulatory effects and metabolic effects of different prostaglandins given I.V. to man. *Prostaglandins*. 1980 Aug **20**:2 333-47.
- Elder DJ, Hague A, Hicks DJ, Paraskeva C. Differential growth inhibition by the aspirin metabolite salicylate in human colorectal tumor cell lines: enhanced apoptosis in carcinoma and in vitro-transformed adenoma relative to adenoma relative to adenoma cell lines. *Cancer Res* 1996 May 15 **56**:10 2273-6.
- Elliott SN, McKnight W, Cirino G, Wallace JL. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 1995 Aug **109**:2 524-30.
- Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Jul 21 **95**:15 8806-11.
- Engelhardt G, Bogel R, Schnitzer C, Utzmann R. Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part I. In vitro findings. *Biochem Pharmacol* 1996 Jan 12 **51**:1 21-8.
- Engelhardt G, Bogel R, Schnitzler C, Utzmann R. Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part II. In vivo findings. *Biochem Pharmacol* 1996 Jan 12 **51**:1 29-38.
- Engelhardt G, Homma D, Schlegel K, Utzmann R, Schnitzler C. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. *Inflamm Res* 1995 Oct **44**:10 423-33.
- Erickson BA, Longo WE, Panesar N, Mazuski JE, Kaminski DL. The effect of selective cyclooxygenase inhibitors on intestinal epithelial cell mitogenesis. *J Surg Res* 1999 Jan **81**:1 101-7.
- Escousse A. Les prostaglandines et leurs applications thérapeutiques. *Lettre Pharmacologue* 1996 **10** 29-35.

F

- Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 1997 Jul 25 **272**:30 18779-89.
- Falardeau P. Prostaglandins in clinical practice. *Union Med Can* 1988 Feb 25 **117**:1 72, 74-6.
- Faour WH, He Y, He QW, de Ladurantaye M, Quintero M, Mancini A, Di Battista JA. Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Aug 24 **276**:34 31720-31.
- Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992 Nov **51**:11 1219-22.
- Fedorak RN, Empey LR, MacArthur C, Jewell LD. Misoprostol provides a colonic mucosal protective effect during acetic acid-induced colitis in rats. *Gastroenterology* 1990 Mar **98**:3 615-25.
- Feng L, Precht P, Balakir R, Horton WE. Evidence of a direct role for Bcl-2 in the regulation of articular chondrocyte apoptosis under the conditions of serum withdrawal and retinoic acid treatment. *J Cell Biochem* 1998 Nov 1 **71**:2 302-9.

- Ferraz JG, Sharkey KA, Reuter BK, Asfaha S, Tigley AW, Brown ML, McKnight W, Wallace JL.** Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. *Gastroenterology* 1997 Jul **113**:1 195-204.
- Ferreira SH, Flower RJ, Parsons MF, Vane JR.** Letter: Reduction of the inflammatory response in rats immunized against prostaglandins. *Prostaglandins*. 1974 Dec 10 **8**:5 433-7.
- Ferreira SH, Vane JR.** Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature* 1967 Dec 2 **216**:118 868-73.
- Fiorucci S, Antonelli E, Santucci L, Morelli O, Miglietti M, Federici B, Mannucci R, Del Soldato P, Morelli A.** Gastrointestinal safety of nitric oxide-derived aspirin is related to inhibition of ICE-like cysteine proteases in rats. *Gastroenterology* 1999a May **116**:5 1089-106.
- Fiorucci S, Santucci L, Cirino G, Mencarelli A, Familiari L, Soldato PD, Morelli A.** IL-1 beta converting enzyme is a target for nitric oxide-releasing aspirin: new insights in the antiinflammatory mechanism of nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Immunol* 2000 Nov 1 **165**:9 5245-54.
- Fiorucci S, Santucci L, Federici B, Antonelli E, Distrutti E, Morelli O, Renzo GD, Coata G, Cirino G, Soldato PD, Morelli A.** Nitric oxide-releasing NSAIDs inhibit interleukin-1beta converting enzyme-like cysteine proteases and protect endothelial cells from apoptosis induced by TNFalpha. *Aliment Pharmacol Ther* 1999b Mar **13**:3 421-35.
- Firestein GS.** Mechanisms of tissue destruction and cellular activation in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1992 Jun **4**:3 348-54.
- Fisher JW.** Prostaglandins and kidney erythropoietin production. *Nephron*. 1980 **25**:2 53-6.
- FitzGerald GA, Smith B, Pedersen AK, Brash AR.** Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N Engl J Med* 1984 Apr 26 **310**:17 1065-8.
- Flower RJ, Vane JR.** Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* 1972 Dec 15 **240**:5381 410-1.
- Forman BM, Chen J, Evans RM.** The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann NY Acad Sci* 1996 Dec 27 **804**: 266-75.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM.** 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995 Dec 1 **83**:5 803-12.
- Franchi Miller C, Saffar JL.** The 5-lipoxygenase inhibitor BWA4C impairs osteoclastic resorption in a synchronized model of bone remodeling. *Bone* 1995 Aug **17**:2 185-91.
- Frazier LW, Yorio T.** Eicosanoids: their function in renal epithelia ion transport. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992 Dec **201**:3 229-43.
- Frolich JC.** A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci*. 1997 Jan **18**:1 30-4.
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P.** The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990 Oct 5 **265**:28 16737-40.
- Fu S, Ramanujam KS, Wong A, Fantry GT, Drachenberg CB, James SP, Meltzer SJ, Wilson KT.** Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* 1999 Jun **116**:6 1319-29.
- Fukada K, Ohtani K, Dan H, Tanaka S.** Interleukin-1 inhibits keratan sulfate production by rabbit chondrocytes: possible role of prostaglandin E2. *Inflamm Res* 1995 **44** 434-7.
- Fulkerson JP, Damiano P.** Effect of prostaglandin E2 on adult pig articular cartilage slices in culture. *Clin Orthop*. 1983 Oct **179** 266-9.
- Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA.** Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J* 1991 Jun **5**:9 2304-12.
- Funk CD, Furci L, FitzGerald GA, Grygorczyk R, Rochette C, Bayne MA, Abramovitz M, Adam M, Metters KM.** Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J Biol Chem* 1993 Dec 15 **268**:35 26767-72.

Futaki N, Arai I, Hamasaka Y, Takahashi S, Higuchi S, Otomo S. Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation. *J Pharm Pharmacol* 1993 Aug **45:8** 753-5.

G

Gabriel SE, Jaakkimainen L, Bombardier C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1991 Nov 15 **115:10** 787-96.

Gans KR, Galbraith W, Roman RJ, Haber SB, Kerr JS, Schmidt WK, Smith C, Hewes WE, Ackerman NR. Anti-inflammatory and safety profile of DuP 697, a novel orally effective prostaglandin synthesis inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 1990 Jul **254:1** 180-7.

Gao X, Grignon DJ, Chbihi T, Zacharek A, Chen YQ, Sakr W, Porter AT, Crissman JD, Pontes JE, Powell IJ. Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer. *Urology* 1995 Aug **46:2** 227-37.

Garavito RM, DeWitt DL. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 1999 Nov 23 **1441:2-3** 278-87.

Garavito RM. The cyclooxygenase-2 structure: new drugs for an old target? *Nat Struct Biol* 1996 Nov **3:11** 897-901.

Garavito RM. The X-ray structures of Escherichia coli porin OmpF and ovine prostaglandin synthase: implications for membrane structure. *Ren Physiol Biochem.* 1994 May-Aug **17:3-4** 219-22.

Garcia-Rodriguez LA, Jick H. Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 1994 Mar 26 **343:8900** 769-72.

Gegout P, Gillet P, Chevrier D, Guingamp C, Terlain B, Netter P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci.* 1994 **55:17** PL321-6.

Gegout P, Gillet P, Terlain B, Netter P. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. *Life Sci.* 1995 **56:20** PL389-94.

Gegout-Pottie P, Philippe L, Simonin MA, Guingamp C, Gillet P, Netter P, Terlain B. Biotelemetry: an original approach to experimental models of inflammation. *Inflamm Res* 1999 Aug **48:8** 417-24.

Geis GS. Update on clinical developments with celecoxib, a new specific COX-2 inhibitor: what can we expect? *J Rheumatol* 1999 Apr **26 Suppl 56:** 31-6.

Geng Y, Blanco FJ, Cornelisson M, Lotz M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. *J Immunol* 1995 Jul 15 **155:2** 796-801.

Ghosh J, Myers CE. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Jun 18 **235:2** 418-23.

Ghosh J, Myers CE. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Oct 27 **95:22** 13182-7.

Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hyland LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR, Offerhaus GJ. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993 May 6 **328:18** 1313-6.

Gierse JK, Hauser SD, Creely DP, Koboldt C, Rangwala SH, Isakson PC, Seibert K. Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochem J* 1995 Jan 15 **305 (Pt 2):** 479-84.

Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K, Isakson PC. Kinetic basis for selective inhibition of cyclooxygenases. *Biochem J* 1999 May 1 **339 (Pt 3):** 607-14.

Gierse JK, McDonald JJ, Hauser SD, Rangwala SH, Koboldt CM, Seibert K. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem* 1996 Jun 28 **271:26** 15810-4.

Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999 Jun **5:6** 698-701.

Gilroy DW, Colville-Nash PR. New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med* 2000 **78:3** 121-9.

- Gilroy DW, Tomlinson A, Greenslade K, Seed MP, Willoughby DA.** The effects of cyclooxygenase 2 inhibitors on cartilage erosion and bone loss in a model of Mycobacterium tuberculosis-induced monoarticular arthritis in the rat. *Inflammation* 1998 Oct **22**:5 509-19.
- Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE.** Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995 Sep 7 **333**:10 609-14.
- Glaser K, Sung ML, O Neill K, Belfast M, Hartman D, Carlson R, Kreft A, Kubrak D, Hsiao CL, Weichman B.** Etodolac selectively inhibits human prostaglandin G/H synthase 2 (PGHS-2) versus human PGHS-1. *Eur J Pharmacol* 1995 Jul 25 **281**:1 107-11.
- Glaser KB.** Cyclooxygenase selectivity and NSAIDs: cyclooxygenase-2 selectivity of etodolac (Iodine). *Inflammopharmacology* 1995 **3**: 335-345.
- Goldberg VJ, Ramwell PW.** Role of prostaglandins in reproduction. *Physiol Rev* 1975 Jul **55**:3 325-51.
- Goldin E, Stalnikowicz R, Wengrower D, Eliakim R, Fich A, Ligumsky M, Karmeli F, Rachmilewitz D.** No correlation between indomethacin-induced gastroduodenal damage and inhibition of gastric prostanoid synthesis. *Aliment Pharmacol Ther* 1988 Aug **2**:4 369-75.
- Goodwin DC, Gunther MR, Hsi LC, Crews BC, Eling TE, Mason RP, Marnett LJ.** Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover. Detection of the radical derivative of tyrosine 385. *J Biol Chem* 1998 Apr 10 **273**:15 8903-9.
- Goodwin DC, Landino LM, Marnett LJ.** Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J* 1999 Jul **13**:10 1121-36.
- Gou Q, Liu CH, Ben Av P, Hla T.** Dissociation of basal turnover and cytokine-induced transcript stabilization of the human cyclooxygenase-2 mRNA by mutagenesis of the 3'-untranslated region. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Jan 26 **242**:3 508-12.
- Gould SR, Brash AR, Conolly ME.** Increased prostaglandin production in ulcerative colitis. *Lancet* 1977 Jul 9 **2**:8028 98.
- Granstrom E, Samuelsson B.** Quantitative measurement of prostaglandins and thromboxanes: general considerations. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 1978 **5**: 1-13.
- Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R.** In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*. 1995 May **21**:5 1465-8.
- Greig GM, Francis DA, Falgoutyret JP, Ouellet M, Percival MD, Roy P, Bayly C, Mancini JA, O Neill GP.** The interaction of arginine 106 of human prostaglandin G/H synthase-2 with inhibitors is not a universal component of inhibition mediated by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Mol Pharmacol* 1997 Nov **52**:5 829-38.
- Griffin MR, Piper JM, Daugherty JR, Snowden M, Ray WA.** Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and increased risk for peptic ulcer disease in elderly persons. *Ann Intern Med*. 1991 Feb 15 **114**:4 257-63.
- Gross G, Imamura T, Vogt SK, Wozniak DF, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ.** Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000 Jun **278**:6 R1415-23.
- Gross GA, Imamura T, Luedke C, Vogt SK, Olson LM, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ.** Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Sep 29 **95**:20 11875-9.
- Grossman CJ, Wiseman J, Lucas FS, Trevethick MA, Birch PJ.** Inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase activity in human platelets and mononuclear cells by NSAIDs and Cox 2 inhibitors. *Inflamm Res* 1995 Jun **44**:6 253-7.
- Gu J, Liu Y, Wen Y, Natarajan R, Lanting L, Nadler JL.** Evidence that 12-lipoxygenase activity induces apoptosis in fibroblasts. *J Cell Physiol* 2001 **186**:3 357-65.
- Guan Y, Chang M, Cho W, Zhang Y, Redha R, Davis L, Chang S, DuBois RN, Hao CM, Breyer M.** Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol* 1997 Jul **273**:1 Pt 2 F18-26.

Guingamp C, Abid A, Gillet P, Netter P, Terlain B. Chondrocyte apoptosis in rat experimental osteoarthritis: time-course studies of bax and Bcl-2 mRNA expression. *Arthritis Rheum* 1998 **41** 241.

Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 1997 Sep **40:9** 1670-9.

Gund P, Shen TY. A model for the prostaglandin synthetase cyclooxygenation site and its inhibition by antiinflammatory arylacetic acids. *J Med Chem* 1977 Sep **20:9** 1146-52.

Guo Q, Kulmacz RJ. Distinct influences of carboxyl terminal segment structure on function in the two isoforms of prostaglandin H synthase. *Arch Biochem Biophys* 2000 Dec 15 **384:2** 269-79.

Guo Q, Wang LH, Ruan KH, Kulmacz RJ. Role of Val509 in time-dependent inhibition of human prostaglandin H synthase-2 cyclooxygenase activity by isoform-selective agents. *J Biol Chem* 1996 Aug 9 **271:32** 19134-9.

Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Reviews* 2001 **1** 11-21

Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 2000 Jan **42:1** 73-8.

Guslandi M. Gastric effects of leukotrienes. *Prostaglandins Leukot Med* 1987 Mar **26:3** 203-8.

H

Halushka PV, Mais DE, Mayeux PR, Morinelli TA. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989 **29**: 213-39.

Ham EA, Soderman DD, Zanetti ME, Dougherty HW, McCauley E, Kuehl FA. Inhibition by prostaglandins of leukotriene B₄ release from activated neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 Jul **80:14** 4349-53.

Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975 Aug **72:8** 2994-8.

Han SK, Kim KP, Koduri R, Bittova L, Munoz NM, Leff AR, Wilton DC, Gelb MH, Cho W. Roles of Trp31 in high membrane binding and proinflammatory activity of human group V phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1999 Apr 23 **274:17** 11881-8.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996 Aug 9 **86:3** 353-64.

Hanasaki K, Ono T, Saiga A, Morioka Y, Ikeda M, Kawamoto K, Higashino K, Nakano K, Yamada K, Ishizaki J, Arita H. Purified group X secretory phospholipase A₂(2) induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 1999 Nov 26 **274:48** 34203-11.

Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano Coico L, Shiff SI, Rigas B. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996 Jul 26 **52:2** 237-45.

Hao X, Bishop AE, Wallace M, Wang H, Willcocks TC, Maclouf J, Polak JM, Knight S, Talbot IC. Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999 Feb **187:3** 295-301.

Hara A, Yoshimi N, Niwa M, Ino N, Mori H. Apoptosis induced by NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human colorectal cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 1997 Jun **88:6** 600-4.

Hara S, Miyata A, Yokoyama C, Inoue H, Brugger R, Lottspeich F, Ullrich V, Tanabe T. Isolation and molecular cloning of prostacyclin synthase from bovine endothelial cells. *J Biol Chem* 1994 Aug 5 **269:31** 19897-903.

Harada Y, Hatanaka K, Kawamura M, Saito M, Ogino M, Majima M, Ohno T, Ogino K, Yamamoto K, Taketani Y, Yamamoto S, Katori M. Role of prostaglandin H synthase-2 in prostaglandin E₂ formation in rat carrageenin-induced pleurisy. *Prostaglandins* 1996 Jan **51:1** 19-33.

Harris DW, Smith PR, Swan CH. Determination of prostaglandin synthetase activity in rectal biopsy material and its significance in colonic disease. *Gut* 1978 Oct **19:10** 875-7.

Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994 Dec **94:6** 2504-10.

- Harris RE, Namboodiri KK, Farrar WB.** Nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer. *Epidemiology* 1996 Mar 7:2 203-5.
- Hartner A, Goppelt Strube M, Hilgers KF.** Coordinate expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney in renovascular hypertension. *Hypertension* 1998 Jan 31:1 Pt 2 201-5.
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M.** Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998 Sep 41:9 1632-8.
- Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, Seegmiller JE, Terkeltaub R, Lotz M.** Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Mar 17 95:6 3094-9.
- Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M.** Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998 Jul 41:7 1266-74.
- Hawkey C, Kahan A, Steinbruck K, Alegre C, Baumelou E, Begaud B, Dequeker J, Isomaki H, Littlejohn G, Mau J, Papazoglou S.** Gastrointestinal tolerability of meloxicam compared to diclofenac in osteoarthritis patients. International MELISSA Study Group. Meloxicam Large-scale International Study Safety Assessment. *Br J Rheumatol* 1998 Sep 37:9 937-45.
- Hawkey CJ, Karrasch JA, Szczepanski L, Walker DG, Barkun A, Swannell AJ, Yeomans ND.** Omeprazole compared with misoprostol for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Omeprazole versus Misoprostol for NSAID-induced Ulcer Management (OMNIUM) Study Group. *N Engl J Med* 1998 Mar 12 338:11 727-34.
- Hawkey CJ.** COX-2 inhibitors. *Lancet* 1999 Jan 23 353:9149 307-14.
- Hawkey CJ.** Management of gastroduodenal ulcers caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000 Feb 14:1 173-92.
- Hawkey CJ.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulcers. *BMJ.* 1990 Feb 3 300:6720 278-84.
- He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW.** PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999 Oct 29 99:3 335-45.
- He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA.** The synthesis of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human OA synovial membrane explants: interactions with anti-inflammatory cytokines. *J Rheumatol* (sous presse).
- Hedqvist P, Raud J, Dahlen SE.** Microvascular actions of eicosanoids in the hamster cheek pouch. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1990 20: 153-60.
- Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW.** Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J Clin Invest* 1994 Jan 93:1 391-6.
- Henry D, Lim LL, Garcia Rodriguez LA, Perez Gutthann S, Carson JL, Griffin M, Savage R, Logan R, Moride Y, Hawkey C, Hill S, Fries JT.** Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. *BMJ.* 1996 Jun 22 312:7046 1563-6.
- Henry JC.** Les Prostaglandines. *IBS* 1988 14: 121-31.
- Herschman HR.** Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 1991 60: 281-319.
- Hertz F, Cloarec A.** Pharmacology of free radicals; recent views on their relation to inflammatory mechanisms. *Life Sci* 1984 Feb 20 34:8 713-20.
- Hidaka T, Hosoe K, Arika Y, Takeo K, Yamashita T, Katsumi I, Kondo H, Yamashita K, Watanabe K.** Pharmacological properties of a new anti-inflammatory compound, alpha-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene)-gamma-butyrolactone (KME-4), and its inhibitory effects on prostaglandin synthetase and 5-lipoxygenase. *Jpn J Pharmacol* 1984 Sep 36:1 77-85.
- Hla T, Bishop Bailey D, Liu CH, Schaeffers HJ, Trifan OC.** Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol* 1999 May 31:5 551-7.
- Hochberg MC, Altman RD, Brandt KD, Clark BM, Dieppe PA, Griffin MR, Moskowitz RW, Schnitzer TJ.** Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part I. Osteoarthritis of the hip. American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum* 1995 Nov 38:11 1535-40.

Hogaboam CM, Befus AD, Wallace JL. Modulation of rat mast cell reactivity by IL-1 beta. Divergent effects on nitric oxide and platelet-activating factor release. *J Immunol* 1993 Oct 1 **151:7** 3767-74.

Hogaboam CM, Bissonnette EY, Chin BC, Befus AD, Wallace JL. Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells. *Gastroenterology* 1993 Jan **104:1** 122-9.

Honda S, Migita K, Hirai Y, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, Kawabe Y, Fukuda T, Kawakami A, Kamachi M, Kita M, Ida H, Aoyagi T, Eguchi K. Induction of COX-2 expression by nitric oxide in rheumatoid synovial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Feb 24 **268:3** 928-31.

Horiguchi S, Ueno R, Hyodo M, Hayaishi O. Alterations in nociception after intracisternal administration of prostaglandin D2, E2 or F2 alpha to conscious mice. *Eur J Pharmacol* 1986 Mar 18 **122:2** 173-9.

Horton JK, Williams AS, Smith Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G. Intracellular measurement of prostaglandin E2: effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. *Anal Biochem* 1999 Jun 15 **271:1** 18-28.

Horton WE, Feng L, Adams C. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. *Matrix Biol* 1998 Jun **17:2** 107-15.

Hosie J, Distel M, Bluhmki E. Meloxicam in osteoarthritis: a 6-month, double-blind comparison with diclofenac sodium. *Br J Rheumatol* 1996 Apr **35 Suppl 1**: 39-43.

Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem* 2000 Apr 14 **275:15** 11397-403.

Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 1999 Jul 22 **400:6742** 378-82.

Huff R, Collins P, Kramer S, Seibert K, Koboldt C, Gregory S, Isakson P. A structural feature of N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl] methanesulfonamide (NS-398) that governs its selectivity and affinity for cyclooxygenase 2 (COX2). *Inflamm Res* 1995 Aug **44 Suppl 2**: S145-6.

Hull MA, Thomson JL, Hawkey CJ. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 by human gastric endothelial cells. *Gut* 1999 Oct **45:4** 529-36.

Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998 Mar 18 **90:6** 455-60.

I

Ichikawa A, Sugimoto Y, Negishi M. Molecular aspects of the structures and functions of the prostaglandin E receptors. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1996 Sep **14:1-3** 83-7.

Ikuta H, Shiota H, Kobayashi S, Yamagishi Y, Yamada K, Yamatsu I, Katayama K. Synthesis and antiinflammatory activities of 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidene)pyrrolidin-2-ones. *J Med Chem* 1987 Nov **30:11** 1995-8.

Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 2000 Sep 8 **275:36** 28028-32.

Iseki S. Immunocytochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the rat stomach. *Histochem J* 1995 Apr **27:4** 323-8.

J

Jackson LM, Wu KC, Mahida YR, Jenkins D, Hawkey CJ. Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa. *Gut* 2000 Dec **47:6** 762-70.

Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res* 2000 Jan 1 **60:1** 184-90.

Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jun 22 **96:13** 7220-5.

Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000 Jun 29 **342:26** 1960-8.

Jensen BL, Kurtz A. Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. *Kidney Int.* 1997 Nov **52:5** 1242-9.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998 Jan 1 **391:6662** 82-6.

Johansson C, Bergstrom S. Prostaglandin and protection of the gastroduodenal mucosa. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1982 **77** 21-46.

Jorgensen TG, Weis-Fogh US, Nielsen HH, Olesen HP. Salicylate- and aspirin-induced uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from the mucosal membrane of the stomach. *Scand J Clin Lab Invest* 1976 Nov **36:7** 649-54.

Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, Nedelec E, Netter P. Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs.* 1997 Apr **53:4** 563-82.

Jovanovic DV, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, Reboul P, Laufer S, Tries S, Pelletier JP. In vivo dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by ML-3000 reduces the progression of experimental osteoarthritis: suppression of collagenase 1 and interleukin-1beta synthesis. *Arthritis Rheum* 2001 Oct **44:10** 2320-30.

K

Kageyama Y, Koide Y, Miyamoto S, Yoshida TO, Inoue T. Leukotrien B4-induced interleukin-1 beta in synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1994 **23:3** 148-50.

Kalbhen DA. Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J Rheumatol.* 1987 May **14 Spec No** 130-1.

Kalgutkar AS, Crews BC, Marnett LJ. Kinetics of the interaction of nonsteroidal antiinflammatory drugs with prostaglandin endoperoxide synthase-1 studied by limited proteolysis. *Biochemistry* 1996 Jul 16 **35:28** 9076-82.

Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, Nanayama T, Miyano M, Kikuno R, Fujii Y, Eguchi N, Toh H, Urade Y, Hayaishi O. Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* 1997 Sep 19 **90:6** 1085-95.

Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'Neill G. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 1996 Aug **111:2** 445-54.

Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 1995 Jun 15 **55:12** 2556-9.

Katori M, Majima M, Harada Y. Possible background mechanisms of the effectiveness of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Inflamm Res* 1998 Oct **47 Suppl 2:** S107-11.

Katori M, Majima M. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res* 2000 Aug **49:8** 367-92.

Katori M. COX-2 inhibitors: background knowledge for clinical use. Summary. *Inflamm Res* 1998 Oct **47 Suppl 2:** S117.

Kaufmann HJ, Taubin HL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs activate quiescent inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 1987 Oct **107:4** 513-6.

Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H. 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 2000 Jul **106:2** 189-97.

Kawai S, Nishida S, Kato M, Furumaya Y, Okamoto R, Koshino T, Mizushima Y. Comparison of cyclooxygenase-1 and -2 inhibitory activities of various nonsteroidal anti-inflammatory drugs using human platelets and synovial cells. *Eur J Pharmacol* 1998 Apr 17 **347:1** 87-94.

Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998 Feb 1 **58:3** 409-12.

Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Mar 15 **90:6** 2160-4.

- Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S, Guan Y, Coffee K, Funk CD, Magnuson MA, Oates JA, Breyer MD, Breyer RM. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat Med* 1999 Feb 5:2 217-20.
- Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, Alden CL. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* 1998 Sep-Oct 26:5 612-20.
- Khanna IK, Weier RM, Yu Y, Collins PW, Miyashiro JM, Koboldt CM, Veenhuizen AW, Currie JL, Seibert K, Isakson PC. 1,2-Diarylpyrroles as potent and selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *J Med Chem* 1997 May 23 40:11 1619-33.
- Khanna IK, Weier RM, Yu Y, Xu XD, Koszyk FJ, Collins PW, Koboldt CM, Veenhuizen AW, Perkins WE, Casler JJ, Masferrer JL, Zhang YY, Gregory SA, Seibert K, Isakson PC. 1,2-Diarylimidazoles as potent, cyclooxygenase-2 selective, and orally active antiinflammatory agents. *J Med Chem* 1997 May 23 40:11 1634-47.
- Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000 Feb 27:2 455-62.
- Kim IK, Lee JH, Sohn HW, Kim HS, Kim SH. Prostaglandin A2 and delta 12-prostaglandin J2 induce apoptosis in L1210 cells. *FEBS Lett* 1993 Apr 26 321:2-3 209-14.
- Kim YM, Talanian RV, Li J, Billiar TR. Nitric oxide prevents IL-1beta and IFN-gamma-inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1beta-converting enzyme). *J Immunol* 1998 Oct 15 161:8 4122-8.
- Kirchner T, Argentieri DC, Barbone AG, Singer M, Steber M, Ansell J, Beers SA, Wachter MP, Wu W, Malloy E, Stewart A, Ritchie DM. Evaluation of the antiinflammatory activity of a dual cyclooxygenase-2 selective/5-lipoxygenase inhibitor, RWJ 63556, in a canine model of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 1997 Aug 282:2 1094-101.
- Klein T, Nusing RM, Pfeilschifter J, Ullrich V. Selective inhibition of cyclooxygenase 2. *Biochem Pharmacol* 1994 Oct 18 48:8 1605-10.
- Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Jul 19 91:15 7355-9.
- Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 29 94:9 4318-23.
- Kliwer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 1992 Aug 27 358:6389 771-4.
- Knezevic I, Borg C, Le Breton GC. Identification of Gq as one of the G-proteins which copurify with human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors. *J Biol Chem* 1993 Dec 5 268:34 26011-7.
- Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999 Mar 29:3 688-96.
- Koide M, Murase Y, Yamato K, Noguchi T, Okahashi N, Nishihara T. Bone morphogenetic protein-2 enhances osteoclast formation mediated by interleukin-1alpha through upregulation of osteoclast differentiation factor and cyclooxygenase-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 May 27 259:1 97-102.
- Komhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nusing RM. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol* 1997 Apr 272:4 Pt 2 F460-8.
- Komhoff M, Jeck ND, Seyberth HW, Grone HJ, Nusing RM, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 expression is associated with the renal macula densa of patients with Bartter-like syndrome. *Kidney Int* 2000 Dec 58:6 2420-4.
- Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Taut A, Sliwowski Z, Stachura J, Hahn EG. Activation of genes for growth factors and cyclooxygenases in rat gastric mucosa during recovery from stress damage. *Eur J Pharmacol* 1998 Jan 19 342:1 55-65.

- Kraemer SA, Meade EA, DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 1992 Mar **293:2** 391-400.
- Kramer HJ, Stinnesbeck B, Klautke G, Kipnowski J, Klingmueller D, Glaenger K, Duesing R.** Interaction of renal prostaglandins with the renin-angiotensin and renal adrenergic nervous systems in healthy subjects during dietary changes in sodium intake. *Clin Sci (Colch)* 1985 Apr **68:4** 387-93.
- Krishnan K, Ruffin MT, Normolle D, Shureiqi I, Burney K, Bailey J, Peters Golden M, Rock CL, Boland CR, Brenner DE.** Colonic Mucosal Prostaglandin E(2) and Cyclooxygenase Expression before and after Low Aspirin Doses in Subjects at High Risk or at Normal Risk for Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001 May **10:5** 447-53.
- Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP.** Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1998 Aug 1 **58:15** 3344-52.
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR.** TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991 Jul 15 **266:20** 12866-72.
- Kujubu DA, Herschman HR.** Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *J Biol Chem* 1992 Apr 25 **267:12** 7991-4.
- Kulmacz RJ, Lands WE.** Protection of prostaglandin H synthase from trypsin upon binding of heme. *Biochem Biophys Res Commun* 1982 Jan 29 **104:2** 758-64.
- Kulmacz RJ, Wang LH.** Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995 Oct 13 **270:41** 24019-23.
- Kulmacz RJ.** Cellular regulation of prostaglandin H synthase catalysis. *FEBS Lett* 1998 Jul 3 **430:3** 154-7.
- Kulmacz RJ.** Topography of prostaglandin H synthase. Antiinflammatory agents and the protease-sensitive arginine 253 region. *J Biol Chem* 1989 Aug 25 **264:24** 14136-44.
- Kunkel SL, Chensue SW, Phan SH.** Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *J Immunol* 1986 Jan **136:1** 186-92.
- Kunkel SL, Wiggins RC, Chensue SW, Larrick J.** Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun* 1986 May 29 **137:1** 404-10.
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC.** Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996 Dec 19-26 **384:6610** 644-8.
- Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, White RL, Prescott SM.** Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 May 14 **93:10** 4816-20.
- Kuwata H, Nakatani Y, Murakami M, Kudo I.** Cytosolic phospholipase A2 is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A2 that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem* 1998 Jan 16 **273:3** 1733-40.
- Kwon G, Corbett JA, Hauser S, Hill JR, Turk J, McDaniel ML.** Evidence for involvement of the proteasome complex (26S) and NFkappaB in IL-1beta-induced nitric oxide and prostaglandin production by rat islets and RINm5F cells. *Diabetes*. 1998 Apr **47:4** 583-91.

L

- Lacey JV Jr, Brinton LA, Abbas FM, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, Greene SM, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Silverberg SG, Hildesheim A.** Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Dec **8:12** 1079-85.
- Laine L, Harper S, Simon T, Bath R, Johanson J, Schwartz H, Stern S, Quan H, Bolognese J.** A randomized trial comparing the effect of rofecoxib, a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, with that of ibuprofen on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis. Rofecoxib Osteoarthritis Endoscopy Study Group. *Gastroenterology* 1999 Oct **117:4** 776-83.

- Laird JM, Herrero JF, Garcia de la Rubia P, Cervero F.** Analgesic activity of the novel COX-2 preferring NSAID, meloxicam in mono-arthritic rats: central and peripheral components. *Inflamm Res* 1997 Jun **46:6** 203-10.
- Lander HM, Sehajpal P, Levine DM, Novogrodsky A.** Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol* 1993 Feb 15 **150:4** 1509-16.
- Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ.** Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Dec 24 **93:26** 15069-74.
- Lands WE, Samuelsson B.** Phospholipid precursors of prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 1968 Oct 22 **164:2** 426-9.
- Lands WE.** The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. *Annu Rev Physiol* 1979 **41**: 633-52.
- Laneville O, Breuer DK, Dewitt DL, Hla T, Funk CD, Smith WL.** Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1994 Nov **271:2** 927-34.
- Lang A, Horler D, Baici A.** The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2000 Aug **27:8** 1970-9.
- Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD.** Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 1995 Nov 3 **83:3** 483-92.
- Langman MJ, Jensen DM, Watson DJ, Harper SE, Zhao PL, Quan H, Bolognese JA, Simon TJ.** Adverse upper gastrointestinal effects of rofecoxib compared with NSAIDs. *JAMA* 1999 Nov 24 **282:20** 1929-33.
- Langman MJ, Weil J, Wainwright P, Lawson DH, Rawlins MD, Logan RF, Murphy M, Vessey MP, Colin-Jones DG.** Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 1994 Apr 30 **343:8905** 1075-8.
- Langman MJ.** Epidemiologic evidence on the association between peptic ulceration and antiinflammatory drug use. *Gastroenterology* 1989 Feb **96:2 Pt 2 Suppl** 640-6.
- Lanza FL, Rack MF, Simon TJ, Quan H, Bolognese JA, Hoover ME, Wilson FR, Harper SE.** Specific inhibition of cyclooxygenase-2 with MK-0966 is associated with less gastroduodenal damage than either aspirin or ibuprofen. *Aliment Pharmacol Ther* 1999 Jun **13:6** 761-7.
- Laporte JR, Carne X, Vidal X, Moreno V, Juan J.** Upper gastrointestinal bleeding in relation to previous use of analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Catalan Countries Study on Upper Gastrointestinal Bleeding. *Lancet* 1991 Jan 12 **337:8733** 85-9.
- Latruffe N, Vamecq J.** Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* 1997 Feb-Mar **79:2-3** 81-94.
- Laufer S, Striegel HG, Neher K, Zechmeister P, Donat C, Stolingwa K, Baur S, Tries S, Kammermeier T, Dannhardt G, Kiefer W.** Synthesis and evaluation of a novel series of pyrrolizine derivatives as dual cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)*. 1997 Oct **330:9-10** 307-12.
- Laufer S, Striegel HG, Neher K, Zechmeister P, Donat C, Stolingwa K, Baur S, Tries S, Kammermeier T, Dannhardt G, Kiefer W.** Synthesis and evaluation of a novel series of pyrrolizine derivatives as dual cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)* 1997 Oct **330:9-10** 307-12.
- Laufer SA, Augustin J, Dannhardt G, Kiefer W.** (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J Med Chem.* 1994 Jun 10 **37:12** 1894-7.
- Leahy KM, Koki AT, Masferrer JL.** Role of cyclooxygenases in angiogenesis. *Curr Med Chem* 2000 Nov **7:11** 1163-70.
- Lee CW, Lewis RA, Corey EJ, Austen KF.** Conversion of leukotriene D4 to leukotriene E4 by a dipeptidase released from the specific granule of human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1983 Jan **48:1** 27-35.
- Lee D, Long SA, Adams JL, Chan G, Vaidya KS, Francis TA, Kikly K, Winkler JD, Sung CM, Debouck C, Richardson S, Levy MA, DeWolf WE Jr, Keller PM, Tomaszek T, Head MS, Ryan MD, Haltiwanger RC, Liang PH, Janson CA, McDevitt PJ, Johanson K, Concha NO, Chan W, Abdel-Meguid SS, Badger**

- AM, Lark MW, Nadeau DP, Suva LJ, Gowen M, Nuttall ME.** Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J Biol Chem.* 2000 May 26 **275:21** 16007-14.
- Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA.** Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997 Feb 7 **272:6** 3406-10.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith_Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA.** An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995 Jun 2 **270:22** 12953-6.
- Leisten JC, Gaarde WA, Scholz W.** Interleukin-6 serum levels correlate with footpad swelling in adjuvant-induced arthritic Lewis rats treated with cyclosporin A or indomethacin. *Clin Immunol Immunopathol* 1990 Jul **56:1** 108-15.
- Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J.** Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem* 1996 Jan 19 **271:3** 1764-9.
- Lesch CA, Gilbertsen RB, Song Y, Dyer RD, Schrier D, Kraus ER, Sanchez B, Guglietta A.** Effects of novel anti-inflammatory compounds on healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998 Oct **287:1** 301-6.
- Leslie CC.** Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1997 Jul 4 **272:27** 16709-12.
- Li CS, Black WC, Chan CC, Ford-Hutchinson AW, Gauthier JY, Gordon R, Guay D, Kargman S, Lau CK, Mancini J, et al.** Cyclooxygenase-2 inhibitors. Synthesis and pharmacological activities of 5-methanesulfonamido-1-indanone derivatives. *J Med Chem.* 1995 Dec 8 **38:25** 4897-905.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997 Nov 14 **91:4** 479-89.
- Li S, Wang Y, Matsumura K, Ballou LR, Morham SG, Blatteis CM.** The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Res* 1999 Apr 17 **825:1-2** 86-94.
- Li Y, Smith T, Grabski S, DeWitt DL.** The membrane association sequences of the prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 isozymes. *J Biol Chem.* 1998 Nov 6 **273:45** 29830-7.
- Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin Shiau SY, Lin JK.** Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett* 2001 May 4 **496:1** 12-8.
- Lianos EA, Guglielmi K, Sharma M.** Regulatory interactions between inducible nitric oxide synthase and eicosanoids in glomerular immune injury. *Kidney Int* 1998 Mar **53:3** 645-53.
- Lianos EA.** Activation and potential interactions between the arachidonic acid and L-arginine:nitric oxide pathways in glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998 Mar **53:3** 540-7.
- Lichtenberger LM, Wang ZM, Romero JJ, Ulloa C, Perez JC, Giraud MN, Barreto JC.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastrointestinal injury. *Nat Med* 1995 Feb **1:2** 154-8.
- Lichtenstein DR, Syngal S, Wolfe MM.** Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract. The double-edged sword. *Arthritis Rheum* 1995 Jan **38:1** 5-18.
- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK.** Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997 Oct 17 **91:2** 197-208.
- Lim HY, Joo HJ, Choi JH, Yi JW, Yang MS, Cho DY, Kim HS, Nam DK, Lee KB, Kim HC.** Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000 Feb **6:2** 519-25.
- Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY.** Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1995 **270** 16487-90.
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ.** cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993 Jan 29; **72:2** 269-78.

- Lin Y, Wu KK, Ruan KH.** Characterization of the secondary structure and membrane interaction of the putative membrane anchor domains of prostaglandin I₂ synthase and cytochrome P450 2C1. *Arch Biochem Biophys* 1998 Apr 1 **352**:1 78-84.
- Linden B, Distel M, Bluhmki E.** A double-blind study to compare the efficacy and safety of meloxicam 15 mg with piroxicam 20 mg in patients with osteoarthritis of the hip. *Br J Rheumatol* 1996 Apr **35 Suppl 1**: 35-8.
- Liou JY, Shyue SK, Tsai MJ, Chung CL, Chu KY, Wu KK.** Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 2000 May 19 **275**:20 15314-20.
- Lipsky LP, Abramson SB, Crofford L, Dubois RN, Simon LS, van de Putte LB.** The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J Rheumatol.* 1998 Dec **25**:12 2298-303.
- Lipsky PE, Isakson PC.** Outcome of specific COX-2 inhibition in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1997 Jul **24 Suppl 49**: 9-14.
- Lipsky PE.** Specific COX-2 inhibitors in arthritis, oncology, and beyond: where is the science headed? *J Rheumatol.* 1999 Apr **26 Suppl 56** 25-30.
- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T.** Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001 May 25 **276**:21 18563-9.
- Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC.** NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998 Oct 1 **58**:19 4245-9.
- Lockard OO, Ivey KJ, Butt JH, Silvano GR, Sisk C, Holt S.** The prevalence of duodenal lesions in patients with rheumatic diseases on chronic aspirin therapy. *Gastrointest Endosc* 1980 Feb **26**:1 5-7.
- Loftin CD, Trivedi DB, Tiano HF, Clark JA, Lee CA, Epstein JA, Morham SG, Breyer MD, Nguyen M, Hawkins BM, Goulet JL, Smithies O, Koller BH, Langenbach R.** Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jan 30 **98**:3 1059-64.
- Loll PJ, Picot D, Ekabo O, Garavito RM.** Synthesis and use of iodinated nonsteroidal antiinflammatory drug analogs as crystallographic probes of the prostaglandin H₂ synthase cyclooxygenase active site. *Biochemistry.* 1996 Jun 11 **35**:23 7330-40.
- Loll PJ, Picot D, Garavito RM.** The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nat Struct Biol.* 1995 Aug **2**:8 637-43.
- Longo WE, Panesar N, Mazuski J, Kaminski DL.** Contribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 to prostanoid formation by human enterocytes stimulated by calcium ionophore and inflammatory agents. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1998 Aug **56**:5-6 325-39.
- Lotz M.** The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 1999 May **25**:2 269-82.
- Lu G, Tsai AL, Van Wart HE, Kulmacz RJ.** Comparison of the peroxidase reaction kinetics of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1999 Jun 4 **274**:23 16162-7.
- Lu X, Errington J, Curtin NJ, Lunec J, Newell DR.** The Impact of p53 Status on Cellular Sensitivity to Antifolate Drugs. *Clin Cancer Res* 2001 Jul 7:7 2114-23.
- Lu X, Xie W, Reed D, Bradshaw WS, Simmons DL.** Nonsteroidal antiinflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Aug 15 **92**:17 7961-5.
- Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, Browner MF.** Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* 1996 Nov **3**:11 927-33.
- Lyons Giordano B, Pratta MA, Galbraith W, Davis GL, Arner EC.** Interleukin-1 differentially modulates chondrocyte expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A₂. *Exp Cell Res* 1993 May **206**:1 58-62.

M

- Maier R, Bilbe G, Rediske J, Lotz M.** Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expression. *Biochim Biophys Acta* 1994 Sep 21 **1208**:1 145-50.

- Malemud CJ, Moskowitz RW, Hassid A.** Prostaglandin biosynthesis by lapine articular chondrocytes in culture. *Biochim Biophys Acta* 1981 Feb 23 **663:2** 480-90.
- Malkinson AM, Koski KM, Dwyer Nield LD, Rice PL, Rioux N, Castonguay A, Ahnen DJ, Thompson H, Pamukcu R, Piazza GA.** Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced mouse lung tumor formation by FGN-1 (sulindac sulfone). *Carcinogenesis* 1998 Aug **19:8** 1353-6.
- Mancini JA, Riendeau D, Falgoutyret JP, Vickers PJ, O'Neill GP.** Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J Biol Chem* 1995 Dec 8 **270:49** 29372-7.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P.** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995 Dec 15 **83:6** 835-9.
- Mankin JH, Dorfman H, Lippiello L, Zarin A.** Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone and Joint Surgery* 1971 **53-A** 523-37.
- Marcus AJ.** Transcellular metabolism of eicosanoids. *Prog Hemost Thromb.* 1986 **8** 127-42.
- Markey CM, Alward A, Weller PE, Marnett LJ.** Quantitative studies of hydroperoxide reduction by prostaglandin H synthase. Reducing substrate specificity and the relationship of peroxidase to cyclooxygenase activities. *J Biol Chem* 1987 May 5 **262:13** 6266-79.
- Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA.** Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem* 1999 Aug 13 **274:33** 22903-6.
- Marnett LJ, Wright TL, Crews BC, Tannenbaum SR, Morrow JD.** Regulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide is revealed by targeted deletion of inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2000 May 5 **275:18** 13427-30.
- Marshall PJ, Kulmacz RJ, Lands WE.** Constraints on prostaglandin biosynthesis in tissues. *J Biol Chem* 1987 Mar 15 **262:8** 3510-7.
- Marshall PJ, Kulmacz RJ.** Prostaglandin H synthase: distinct binding sites for cyclooxygenase and peroxidase substrates. *Arch Biochem Biophys* 1988 Oct **266:1** 162-70.
- Martel-Pelletier J.** Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998 Nov **6:6** 374-6.
- Masferrer JL, Zweifel BS, Seibert K, Needleman P.** Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J Clin Invest* 1990 Oct **86:4** 1375-9.
- Mastbergen S, Lafeber F, Bijlsma W et al.** Inflammation induced cartilage damage is COX-2 mediated and can be prevented by celecoxib. *Arthritis Rheum* 2000 **43(Suppl)** S349.
- Mastino A, Piacentini M, Grelli S, Favalli C, Autuori F, Tentori L, Oliverio S, Garaci E.** Induction of apoptosis in thymocytes by prostaglandin E2 in vivo. *Dev Immunol* 1992 **2:4** 263-71.
- Mathias MM, Dupont J.** The relationship of dietary fats to prostaglandin biosynthesis. *Lipids* 1979 Feb **14:2** 247-52.
- Maycock AL, Anderson MS, DeSousa DM, Kuehl FA Jr.** Leukotriene A4: preparation and enzymatic conversion in a cell-free system to leukotriene B4. *J Biol Chem* 1982 Dec 10 **257:23** 13911-4.
- Mayeux PR, Mais DE, Carr C, Halushka PV.** Human erythroleukemia cells express functional thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1989 Sep **250:3** 923-7.
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, Fitzgerald GA.** Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 **96:** 272-7.
- McAdam BF, Mardini IA, Habib A, Burke A, Lawson JA, Kapoor S, Fitzgerald GA.** Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. *J Clin Invest* 2000 May **105:10** 1473-82.
- McCarthy CJ, Crofford LJ, Greenson J, Scheiman JM.** Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1999 May **94:5** 1218-23.

- McCartney SA, Mitchell JA, Fairclough PD, Farthing MJ, Warner TD.** Selective COX-2 inhibitors and human inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1999 Aug **13:8** 1115-7.
- McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, Kinninmonth A, Weidner J, Mumford R, Liew FY.** Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 1996 Oct 1 **184:4** 1519-24.
- McKenzie LS, Horsburgh BA, Ghosh P, Taylor TK.** Effect of anti-inflammatory drugs on sulphated glycosaminoglycan synthesis in aged human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1976 Dec **35:6** 487-97.
- Meade EA, Smith WL, DeWitt DL.** Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 1993 Mar 25 **268:9** 6610-4.
- Mertz PM, DeWitt DL, Stetler Stevenson WG, Wahl LM.** Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol Chem* 1994 Aug 19 **269:33** 21322-9.
- Mestre JR, Rivadeneira DE, Mackrell PJ, Duff M, Stapleton PP, Mack Strong V, Maddali S, Smyth GP, Tanabe T, Daly JM.** Overlapping CRE and E-box promoter elements can independently regulate COX-2 gene transcription in macrophages. *FEBS Lett* 2001 May 11 **496:2-3** 147-51.
- Minghetti L, Hughes P, Perry VH.** Restricted cyclooxygenase-2 expression in the central nervous system following acute and delayed-type hypersensitivity responses to bacillus Calmette-Guerin. *Neuroscience* 1999 **92:4** 1405-15.
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR.** Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Dec 15 **90:24** 11693-7.
- Mitchell JA, Evans TW.** Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflamm Res* 1998 Oct **47 Suppl 2:** S88-92.
- Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ.** Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem Pharmacol* 1995 Nov 9 **50:10** 1535-42.
- Mitrovic D, Lippiello L, Gruson F, Aprile F, Mankin HJ.** Effects of various prostanoids on the in vitro metabolism of bovine articular chondrocytes. *Prostaglandins.* 1981 Sep **22:3** 499-511.
- Miwa M, Saura R, Hirata S, Hayashi Y, Mizuno K, Itoh H.** Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E(2) through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 2000 Jan **8:1** 17-24.
- Mizel SB, Dayer JM, Krane SM, Mergenhagen SE.** Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin 1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Apr **78:4** 2474-7.
- Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, Wada K, Uchida T, Noguchi H, Akamatsu T, Kasuga M.** Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology* 1997 Feb **112:2** 387-97.
- Mizuno K, Yamamoto S, Lands WE.** Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on fatty acid cyclooxygenase and prostaglandin hydroperoxidase activities. *Prostaglandins* 1982 May **23:5** 743-57.
- Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J.** Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* 1997 Sep **40:9** 1653-61.
- Mollace V, Colasanti M, Muscoli C, Lauro GM, Iannone M, Rotiroti D, Nistico G.** The effect of nitric oxide on cytokine-induced release of PGE2 by human cultured astroglial cells. *Br J Pharmacol* 1998 Jun **124:4** 742-6.
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR.** An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature.* 1976 Oct 21 **263:5579** 663-5.
- Moncada S, Higgs A.** The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993 Dec 30 **329:27** 2002-12.
- Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tian HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA.** Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995 Nov 3 **83:3** 473-82.

- Morisset S, Patry C, Lora M, de Brum Fernandes AJ.** Regulation of cyclooxygenase-2 expression in bovine chondrocytes in culture by interleukin 1alpha, tumor necrosis factor-alpha, glucocorticoids, and 17beta-estradiol. *J Rheumatol* 1998 Jun **25**:6 1146-53.
- Morita I, Schnider M, Regier MK, Otto JC, Hori T.** Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase -1 and -2. *J Biol Chem* 1995 **270** 10902-8.
- Morrison BW, Fricke J, Brown J, Yuan W, Kotey P, Mehlisch D.** The optimal analgesic dose of rofecoxib: Overview of six randomized controlled trials. *J Am Dent Assoc.* 2000 Dec **131**:12 1729-37.
- Morteau O, Morham SG, Sellon R, Dieleman LA, Langenbach R, Smithies O, Sartor RB.** Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 2000 Feb **105**:4 469-78.
- Muir H, Carney SL, Hall LG.** Effects of tiaprofenic acid and other NSAIDs on proteoglycan metabolism in articular cartilage explants. *Drugs.* 1988 **35 Suppl 1** 15-23.
- Mukherjee AB, Miele L, Pattabiraman N.** Phospholipase A2 enzymes: regulation and physiological role. *Biochem Pharmacol* 1994 Jul 5 **48**:1 1-10.
- Mukherjee P, Rachita C, Aisen PS, Pasinetti GM.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs protect against chondrocyte apoptotic death. *Clin Exp Rheumatol* 2001 **19**:1 Suppl **22** S7-11.
- Muller N, Payan E, Lopicque F, Bannwarth B, Netter P.** Pharmacological aspects of chiral nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundam Clin Pharmacol* 1990 **4**:6 617-34.
- Murakami M, Bingham CO 3rd, Matsumoto R, Austen KF, Arm JP.** IgE-dependent activation of cytokine-primed mouse cultured mast cells induces a delayed phase of prostaglandin D2 generation via prostaglandin endoperoxide synthase-2. *J Immunol* 1995b Nov 1 **155**:9 4445-53.
- Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Higashino K, Hanasaki K, Arita H, Horiguchi M, Arita M, Arai H, Inoue K, Kudo I.** Different functional aspects of the group II subfamily (Types IIA and V) and type X secretory phospholipase A(2)s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation. *J Biol Chem* 1999c Oct 29 **274**:44 31435-44.
- Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Kudo I.** Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem* 1999a Jan 29 **274**:5 3103-15.
- Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Yamamoto S, Kuwata H, Kudo I.** Functional association of type IIA secretory phospholipase A(2) with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 1999b Oct 15 **274**:42 29927-36.
- Murakami M, Koduri RS, Enomoto A, Shimbara S, Seki M, Yoshihara K, Singer A, Valentin E, Ghomashchi F, Lambeau G, Gelb MH, Kudo I.** Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipase A2s in human embryonic kidney 293 and rat mastocytoma RBL-2H3 cells through heparan sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms. *J Biol Chem* 2001 Mar 30 **276**:13 10083-96.
- Murakami M, Kuwata H, Amakasu Y, Shimbara S, Nakatani Y, Atsumi G, Kudo I.** Prostaglandin E2 amplifies cytosolic phospholipase A2- and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic cells. Enhancement by secretory phospholipase A2. *J Biol Chem* 1997 Aug 8 **272**:32 19891-7.
- Murakami M, Matsumoto R, Austen KF, Arm JP.** Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 couple to different transmembrane stimuli to generate prostaglandin D2 in mouse bone marrow-derived mast cells. *J Biol Chem* 1994 Sep 2 **269**:35 22269-75.
- Murakami M, Matsumoto R, Urade Y, Austen KF, Arm JP.** c-kit ligand mediates increased expression of cytosolic phospholipase A2, prostaglandin endoperoxide synthase-1, and hematopoietic prostaglandin D2 synthase and increased IgE-dependent prostaglandin D2 generation in immature mouse mast cells. *J Biol Chem* 1995a Feb 17 **270**:7 3239-46.
- Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I.** Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000 Oct 20 **275**:42 32783-92.

Murakami M, Shimbara S, Kambe T, Kuwata H, Winstead MV, Tischfield JA, Kudo I. The functions of five distinct mammalian phospholipase A2S in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A2S are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1998 Jun 5 **273:23** 14411-23.

Muscara MN, Vergnolle N, Lovren F, Triggle CR, Elliott SN, Asfaha S, Wallace JL. Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. *Br J Pharmacol* 2000 Apr **129:7** 1423-30.

Muth Selbach US, Tegeder I, Brune K, Geisslinger G. Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. *Anesthesiology* 1999 Jul **91:1** 231-9.

Myers C, Koki A, Pamukcu R, Wechter W, Padley RJ. Proapoptotic anti-inflammatory drugs. *Urology* 2001 Apr **57:4 Suppl 1** 73-6.

N

Nagata A, Suzuki Y, Igarashi M, Eguchi N, Toh H, Urade Y, Hayaishi O. Human brain prostaglandin D synthase has been evolutionarily differentiated from lipophilic-ligand carrier proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 May 1 **88:9** 4020-4.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997 Feb 7 **88:3** 355-65.

Nakatani N, Uozumi N, Kume K, Murakami M, Kudo I, Shimizu T. Role of cytosolic phospholipase A2 in the production of lipid mediators and histamine release in mouse bone-marrow-derived mast cells. *Biochem J* 2000 Dec 1 **352 Pt 2** 311-7.

Nakatsugi S, Fukutake M, Takahashi M, Fukuda K, Isoi T, Taniguchi Y, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppression of intestinal polyp development by nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in Min mice. *Jpn J Cancer Res* 1997 Dec **88:12** 1117-20.

Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, Irie A, Ushikubi F, Kakizuka A, Ito S, Ichikawa A, Narumiya S. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature* 1993 Sep 9 **365:6442** 166-70.

Naraba H, Murakami M, Matsumoto H, Shimbara S, Ueno A, Kudo I, Oh-ishi S. Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. *J Immunol* 1998 Mar 15 **160:6** 2974-82.

Navar LG, Inscho EW, Majid SA, Imig JD, Harrison Bernard LM, Mitchell KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev* 1996 Apr **76:2** 425-536.

Nedelec E, Abid A, Cipolletta C, Presle N, Terlain B, Netter P, Jouzeau J. Stimulation of cyclooxygenase-2-activity by nitric oxide-derived species in rat chondrocyte: lack of contribution to loss of cartilage anabolism. *Biochem Pharmacol* 2001 Apr 15 **61:8** 965-78.

Needleman P, Moncada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, Samuelsson B. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides. *Nature* 1976 Jun 17 **261:5561** 558-60.

Needleman P, Raz A, Minkes MS, Ferrendelli JA, Sprecher H. Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 Feb **76:2** 944-8.

Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986 **55:** 69-102.

Negishi M, Namba T, Sugimoto Y, Irie A, Katada T, Narumiya S, Ichikawa A. Opposite coupling of prostaglandin E receptor EP3C with Gs and G(o). Stimulation of Gs and inhibition of G(o). *J Biol Chem*. 1993 Dec 15 **268:35** 26067-70.

Nemeth JF, Hochgesang GP, Marnett LJ, Caprioli RM. Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry. *Biochemistry* 2001 Jul 24 **40:29** 8606.

Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ. Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Aug 8 **237:1** 28-32.

Newton R, Seybold J, Liu SF, Barnes PJ. Alternate COX-2 transcripts are differentially regulated: implications for post-transcriptional control. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 May 8 **234:1** 85-9.

Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1 **89**:7 3030-4.

Nikolic D, van Breemen RB. DNA oxidation induced by cyclooxygenase-2. *Chem Res Toxicol* 2001 Apr **14**:4 351-4.

Nishida K, Doi T, Matsuo M, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, Yoshida A, Shibahara M, Inoue H. Involvement of nitric oxide in chondrocyte cell death in chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001 Apr **9**:3 232-7.

Nishigaki N, Negishi M, Sugimoto Y, Namba T, Narumiya S, Ichikawa A. Characterization of the prostaglandin E receptor expressed on a cultured mast cell line, BNu-2c13. *Biochem Pharmacol* 1993 Sep 1 **46**:5 863-9.

Noble S, Balfour JA. Meloxicam. *Drugs* 1996 Mar **51**:3 424-30; discussion 431-32.

Nogawa S, Forster C, Zhang F, Nagayama M, Ross ME, Iadecola C. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Sep 1 **95**:18 10966-71.

Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol.* 2000 Sep 15 **165**:6 3402-10.

O

O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V, Young DA. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* 1991 Dec 5 **266**:34 23261-7.

O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE, Rosier RN. Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1992 Apr **7**:4 397-404.

O'Neill GP, Mancini JA, Kargman S, Yergey J, Kwan MY, Falgoutyret JP, Abramovitz M, Kennedy BP, Ouellet M, Cromlish W. Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccinia virus: inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyicosatetraenoic acid. *Mol Pharmacol* 1994 Feb **45**:2 245-54.

Oates JA. The 1982 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science* 1982 Nov 19 **218**:4574 765-8.

O'Brien WF. The role of prostaglandins in labor and delivery. *Clin Perinatol.* 1995 Dec **22**:4 973-84.

Ochiai M, Oguri T, Isobe T, Ishioka S, Yamakido M. Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA expression levels in normal lung tissues and non-small cell lung cancers. *Jpn J Cancer Res* 1999 Dec **90**:12 1338-43.

Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Jan 18 **91**:2 504-8.

Ohashi K, Ruan KH, Kulmacz RJ, Wu KK, Wang LH. Primary structure of human thromboxane synthase determined from the cDNA sequence. *J Biol Chem* 1992 Jan 15 **267** 2789-93.

Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, Hasegawa K, Iseki H, Tsunozaki H, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001 May 15 **91**:10 1876-81.

Olsson LE, Wheeler MA, Sessa WC, Weiss RM. Bladder instillation and intraperitoneal injection of *Escherichia coli* lipopolysaccharide up-regulate cytokines and iNOS in rat urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 1998 Mar **284**:3 1203-8.

Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, Seo H, Ohta H, Nozawa S, Kudo I, Suda T. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol* 1996 Jan 15 **156**:2 758-64.

Orning L, Hammarstrom S. Inhibition of leukotriene C and leukotriene D biosynthesis. *J Biol Chem* 1980 Sep 10 **255**:17 8023-6.

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996 Nov 29 **87**:5 803-9.

Otto JC, Smith WL. The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1994 Aug 5 **269:31** 19868-75.

Ouellet M, Percival MD. Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem J*. 1995 Feb 15 **306 (Pt 1)** 247-51.

Ouellet M, Percival MD. Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms. *Arch Biochem Biophys* 2001 Mar 15 **387:2** 273-80.

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990 Jun **143:3** 420-30.

P

Pairet M, Netter P. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: importance and limitations. *Thérapie* 1999 Jul Aug **54:4** 433-45

Pairet M, van Ryn J, Schierok H, Mauz A, Trummlitz G, Engelhardt G. Differential inhibition of cyclooxygenases-1 and -2 by meloxicam and its 4'-isomer. *Inflamm Res*. 1998 Jun **47:6** 270-6.

Pairet M, van Ryn J. Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*. 1998 Oct **47 Suppl 2** S93-101.

Panara MR, Padovano R, Sciulli MG, Santini G, Renda G, Rotondo MT, Pace A, Patrono C, Patrignani P. Effects of nimesulide on constitutive and inducible prostanoid biosynthesis in human beings. *Clin Pharmacol Ther* 1998 Jun **63:6** 672-81.

Panara MR, Renda G, Sciulli MG, Santini G, Di Giamberardino M, Rotondo MT, Tacconelli S, Seta F, Patrono C, Patrignani P. Dose-dependent inhibition of platelet cyclooxygenase-1 and monocyte cyclooxygenase-2 by meloxicam in healthy subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Jul **290:1** 276-80.

Pang L, Houtl JR. Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E2 and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages. *Biochem Pharmacol* 1997 Feb 21 **53:4** 493-500.

Patel R, Attur MG, Dave M, Abramson SB, Amin AR. Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E2 production by nitric oxide in activated murine macrophages. *J Immunol*. 1999 Apr 1 **162:7** 4191-7.

Patrignani P, Panara MR, Greco A, Fusco O, Natoli C, Iacobelli S, Cipollone F, Ganci A, Creminon C, Maclouf J. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther* 1994 Dec **271:3** 1705-12.

Patrignani P, Panara MR, Sciulli MG, Santini G, Renda G, Patrono C. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* 1997 Dec **48:4** 623-31.

Paulson SK, Hribar JD, Liu NW, Hajdu E, Bible RH, Piergies A, Karim A. Metabolism and excretion of [(14)C]celecoxib in healthy male volunteers. *Drug Metab Dispos* 2000 Mar **28:3** 308-14.

Paulson SK, Zhang JY, Breau AP, Hribar JD, Liu NW, Jessen SM, Lawal YM, Cogburn JN, Gresk CJ, Markos CS, Maziasz TJ, Schoenhard GL, Burton EG. Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab Dispos* 2000 May **28:5** 514-21.

Paulus HE. FDA Arthritis Advisory Committee meeting: postmarketing surveillance of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum* 1985 Oct **28:10** 1168-9.

Pelham HR. Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* 1989 **5:** 1-23.

Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. In vitro effects of tiaprofenic acid, sodium salicylate and hydrocortisone on the proteoglycan metabolism of human osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol* 1989 May **16:5** 646-55.

Pelletier JP, Faure MP, DiBattista JA, Wilhelm S, Visco D, Martel-Pelletier J. Coordinate synthesis of stromelysin, interleukin-1, and oncogene proteins in experimental osteoarthritis. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 1993 Jan **142:1** 95-105.

Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J. Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *J Rheumatol*. 2001 Nov **28:11** 2509-19.

- Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J.** Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *J Rheumatol.* 2001 Nov **28**:11 2509-19.
- Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau Coman V, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR, Currie MG, Martel-Pelletier J.** Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* 2000 Jun **43**:6 1290-9.
- Pelletier JP, Lajeunesse D, Jovanovic DV, Lascau Coman V, Jolicoeur FC, Hilal G, Fernandes JC, Martel-Pelletier J.** Carprofen simultaneously reduces progression of morphological changes in cartilage and subchondral bone in experimental dog osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000 Dec **27**:12 2893-902.
- Pelletier JP, Lascau Coman V, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Martel-Pelletier J.** Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol* 1999 Sep **26**:9 2002-14.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB.** Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 2001 Jun **44**:6 1237-47.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J.** In vivo protective effects of prophylactic treatment with tiaprofenic acid or intraarticular corticosteroids on osteoarthritic lesions in the experimental dog model. *J Rheumatol Suppl.* 1991 Feb **27** 127-30.
- Penglis PS, Cleland LG, Demasi M, Caughey GE, James MJ.** Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitors. *J Immunol* 2000 Aug 1 **165**:3 1605-11.
- Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Docter S, Graneto MJ, Lee LF, Malecha JW, Miyashiro JM, Rogers RS, Rogier DJ, Yu SS, Anderson GD, Burton EG, Cogburn JN, Gregory SA, Koboldt CM, Perkins WE, Seibert K, Veenhuizen AW, Zhang YY, Isakson PC.** Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* 1997 Apr 25 **40**:9 1347-65.
- Pettipher ER, Henderson B, Edwards JC, Higgs GA.** Effect of indomethacin on swelling, lymphocyte influx, and cartilage proteoglycan depletion in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1989 Aug **48**:8 623-7.
- Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, Bordji K, Terlain B, Netter P, Gillet P.** Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Physiol.* 1997 Oct **273**:4 Pt 2 R1550-6.
- Piazza GA, Alberts DS, Hixson LJ, Paranka NS, Li H, Finn T, Bogert C, Guillen JM, Brendel K, Gross PH, Sperl G, Ritchie J, Burt RW, Ellsworth L, Ahnen DJ, Pamukcu R.** Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels. *Cancer Res* 1997 Jul 15 **57**:14 2909-15.
- Piazza GA, Rahm AK, Finn TS, Fryer BH, Li H, Stoumen AL, Pamukcu R, Ahnen DJ.** Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res* 1997 Jun 15 **57**:12 2452-9.
- Piazza GA, Rahm AL, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH, Brendel K, Burt RW, Alberts DS, Pamukcu R.** Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1995 Jul 15 **55**:14 3110-6.
- Picot D, Loll PJ, Garavito RM.** The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 1994 Jan 20 **367**:6460 243-9.
- Pinto DJ, Batt DG, Pitts WJ, Petratis JJ, Orwat MJ, Wang S, Jetter JW, Sherk SR, Houghton GC, Copeland RA, Covington MB, Trzaskos JM, Magolda RL.** Terphenyl cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: optimization of the central ring and o-biphenyl analogs. *Bioorg Med Chem Lett.* 1999 Apr 5 **9**:7 919-24.
- Pond MJ, Nuki G.** Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis.* 1973 Jul **32**:4 387-8.
- Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC.** Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med.* 1996 Sep 1 **184**:3 883-91.

Prescott SM. Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer? *J Clin Invest.* 2000 Jun **105:11** 1511-3.

Q

Qiao L, Hanif R, Sphicas E, Shiff SJ, Rigas B. Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 1998 Jan 1 **55:1** 53-64.

R

Radmark O, Malmsten C, Samuelsson B, Clark DA, Goto G, Marfat A, Corey EJ. Leukotriene A: stereochemistry and enzymatic conversion to leukotriene B. *Biochem Biophys Res Commun* 1980a Feb 12 **92:3** 954-61.

Radmark O, Malmsten C, Samuelsson B, Goto G, Marfat A, Corey EJ. Leukotriene A. Isolation from human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1980b Dec 25 **255:24** 11828-31.

Radmark O, Shimizu T, Jornvall H, Samuelsson B. Leukotriene A4 hydrolase in human leukocytes. Purification and properties. *J Biol Chem* 1984 Oct 25 **259:20** 12339-45.

Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Sato T, Hayashi H, Ono T, Yamanoi A, Kohno H, Nagasue N. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and cox-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of cox-2 in the angiogenesis of hepatitis c virus-positive cases. *Clin Cancer Res* 2001 May 7; **5** 1325-32.

Rainsford KD, Ying C, Smith F. Effects of 5-lipoxygenase inhibitors on interleukin production by human synovial tissues in organ culture: comparison with interleukin-1-synthesis inhibitors. *J Pharm Pharmacol.* 1996 Jan **48:1** 46-52.

Rainsford KD, Ying C, Smith FC. Effects of meloxicam, compared with other NSAIDs, on cartilage proteoglycan metabolism, synovial prostaglandin E2, and production of interleukins 1, 6 and 8, in human and porcine explants in organ culture. *J Pharm Pharmacol* 1997 Oct **49:10** 991-8.

Rampton DS, McNeil NI, Sarner M. Analgesic ingestion and other factors preceding relapse in ulcerative colitis. *Gut* 1983 Mar **24:3** 187-9.

Rashad S, Low F, Revell P, Hemingway A, Rainsford K, Walker F. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on course of osteoarthritis. *Lancet* 1989 Nov 11 **2:8672** 1149.

Ratcliffe A, Rosenwasser MP, Mahmud F, Glazer PA, Saed-Nejad F, Lane N, Mow VC. The in vivo effects of naproxen on canine experimental osteoarthritic articular cartilage: composition, metalloproteinase activities and metabolism. *Agents Actions Suppl* 1993 **39**: 207-11.

Raud J, Dahlen SE, Sydbom A, Lindbom L, Hedqvist P. Prostaglandin modulation of mast cell-dependent inflammation. *Agents Actions* 1989 Jan **26:1-2** 42-4.

Raud J, Sydbom A, Dahlen SE, Hedqvist P. Prostaglandin E2 prevents diclofenac-induced enhancement of histamine release and inflammation evoked by in vivo challenge with compound 48/80 in the hamster cheek pouch. *Agents Actions* 1989 Aug **28:1-2** 108-14.

Raz A, Wyche A, Needleman P. Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Mar **86:5** 1657-61.

Reddy BS, Rao CV, Seibert K. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996 Oct 15 **56:20** 4566-9.

Reddy S, Rao GH, Murthy M. Differential effects of phorbol 12-myristate 13-acetate and diacylglycerols on thromboxane A2-independent phospholipase A2 activation in collagen-stimulated human platelets. *Biochem Med Metab Biol.* 1994 Apr **51:2** 118-28.

Reddy ST, Herschman HR. Prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2 are coupled to distinct phospholipases for the generation of prostaglandin D2 in activated mast cells. *J Biol Chem* 1997 Feb 7 **272:6** 3231-7.

Reddy ST, Winstead MV, Tischfield JA, Herschman HR. Analysis of the secretory phospholipase A2 that mediates prostaglandin production in mast cells. *J Biol Chem* 1997 May 23 **272:21** 13591-6.

Reeves JJ, Bunce KT, Sheldrick RLC, Stables R. Evidence of the PGE receptor subtype mediating inhibition of acid secretion in the rat. *Br J Pharmacol* 1998 **95**: 805P.

- Regier MK, Otto JC, DeWitt DL, Smith WL.** Localization of prostaglandin endoperoxide synthase-1 to the endoplasmic reticulum and nuclear envelope is independent of its C-terminal tetrapeptide-PTEL. *Arch Biochem Biophys* 1995 Mar 10 **317:2** 457-63.
- Reilly IA, FitzGerald GA.** Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood* 1987 Jan **69:1** 180-6.
- Reimer R, Heim HK, Muallem R, Odes HS, Sewing KF.** Effects of EP-receptor subtype specific agonists and other prostanoids on adenylate cyclase activity of duodenal epithelial cells. *Prostaglandins* 1992 Nov **44:5** 485-93.
- Ren Y, Loose Mitchell DS, Kulmacz RJ.** Prostaglandin H synthase-1: evaluation of C-terminus function. *Arch Biochem Biophys* 1995 Feb 1 **316:2** 751-7.
- Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL.** Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1996 Nov 1 **98:9** 2076-85.
- Richardson C, Emery P.** The clinical implications of inhibition of the inducible form of cyclo-oxygenase. *Drug Saf.* 1996 Oct **15:4** 249-60.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK.** The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998 Jan 1 **391:6662** 79-82.
- Ricupero D, Taylor L, Polgar P.** Interactions of bradykinin, calcium, G-protein and protein kinase in the activation of phospholipase A2 in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Agents Actions* 1993 Sep **40:1-2** 110-8.
- Rieke CJ, Mulichak AM, Garavito RM, Smith WL.** The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. *J Biol Chem* 1999 Jun 11 **274:24** 17109-14.
- Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dube D, Ethier D, Falgoutyret JP, Friesen RW, Gordon R, Greig G, Guay J, Mancini J, Ouellet M, Wong E, Xu L, Boyce S, Visco D, Girard Y, Prasit P, Zamboni R, Rodger IW, Gresser M, Ford Hutchinson AW, Young RN, Chan CC.** Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* 2001 Feb **296:2** 558-66.
- Ristimäki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M.** Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res.* 1997 Apr 1 **57:7** 1276-80.
- Ristimäki A, Narko K, Hla T.** Down-regulation of cytokine-induced cyclo-oxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation. *Biochem J* 1996 Aug 15 **318 (Pt 1):** 325-31.
- Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ.** Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* 1979 Sep **77:3** 433-43.
- Robert A.** Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 1979 Oct **77:4 Pt 1** 761-7.
- Robinson DR, Tashjian AH, Levine L.** Prostaglandin-stimulated bone resorption by rheumatoid synovia. A possible mechanism for bone destruction in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1975 Nov **56:5** 1181-8.
- Rocca B, Spain LM, Pure E, Langenbach R, Patrono C, FitzGerald GA.** Distinct roles of prostaglandin H synthases 1 and 2 in T-cell development. *J Clin Invest* 1999 May 15 **103:10** 1469-77.
- Rocha GM, Michea LF, Peters EM, Kirby M, Xu Y, Ferguson DR, Burg MB.** Direct toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs for renal medullary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 24 **98:9** 5317-22.
- Rola-Pleszczynski M, Lemaire I.** Leukotrienes augment interleukin 1 production by human monocytes. *J Immunol.* 1985 Dec **135:6** 3958-61.
- Roman RJ, Lechene C.** Prostaglandin E2 and F2 alpha reduces urea reabsorption from the rat collecting duct. *Am J Physiol* 1981 Jul **241:1** F53-60.
- Romano M, Catalano A, Nutini M, D'Urbano E, Crescenzi C, Claria J, Libner R, Davi G, Procopio A.** 5-lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival : involvement of vascular endothelial growth factor. *FASEB J* 2001 **15:13** 2326-36.
- Rome LH, Lands WE.** Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975 Dec **72:12** 4863-5.

Rossat J, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1999 Jul **66**:1 76-84.

Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* 2000 Jan 6 **403**:6765 103-8.

Roux-Lombard P, Eberhardt K, Saxne T, Dayer JM, Wollheim FA. Cytokines, metalloproteinases, their inhibitors and cartilage oligomeric matrix protein: relationship to radiological progression and inflammation in early rheumatoid arthritis. A prospective 5-year study. *Rheumatology (Oxford)* 2001 May **40**:5 544-51.

Rouzer CA, Kargman S. Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J Biol Chem* 1988 Aug 5 **263**:22 10980-8.

Rouzer CA, Matsumoto T, Samuelsson B. Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Feb **83**:4 857-61.

S

Saag K, van der Heijde D, Fisher C, Samara A, DeTora L, Bolognese J, Sperling R, Daniels B. Rofecoxib, a new cyclooxygenase 2 inhibitor, shows sustained efficacy, comparable with other nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a 6-week and a 1-year trial in patients with osteoarthritis. Osteoarthritis Studies Group. *Arch Fam Med.* 2000 Nov-Dec **9**:10 1124-34.

Sadowski T, Steinmeyer J. Effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001 Jul **9**:5 407-15.

Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, Saito I, Miyasaka N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 1995 Nov **96**:5 2357-63.

Salmon JA, Higgs GA, Vane JR, Bitensky L, Chayen J, Henderson B, Cashman B. Synthesis of arachidonate cyclo-oxygenase products by rheumatoid and nonrheumatoid synovial lining in nonproliferative organ culture. *Ann Rheum Dis* 1983 Feb **42**:1 36-9.

Salvemini D, Masferrer JL. Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Methods Enzymol* 1996 **269**: 12-25.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Aug 1 **90**:15 7240-4.

Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol Life Sci.* 1997 **53**:7 576-82.

Samaha HS, Kelloff GJ, Steele V, Rao CV, Reddy BS. Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. *Cancer Res* 1997 Apr 1 **57**:7 1301-5.

Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983 May 6 **220**:4597 568-75.

Sano H, Hla T, Maier JA, Crofford LJ, Case JP, Maciag T, Wilder RL. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest* 1992 Jan **89**:1 97-108.

Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995 Sep 1 **55**:17 3785-9.

Sasaki K, Hattori T, Fujisawa T, Takahashi K, Inoue H, Takigawa M. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem (Tokyo)* 1998 Mar **123**:3 431-9.

Saunders MA, Belvisi MG, Cirino G, Barnes PJ, Warner TD, Mitchell JA. Mechanisms of prostaglandin E2 release by intact cells expressing cyclooxygenase-2: evidence for a 'two-component' model. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Mar **288**:3 1101-6

Saunders MA, Sansores-Garcia L, Gilroy DW, Wu KK. Selective suppression of CCAAT/enhancer-binding protein beta binding and cyclooxygenase-2 promoter activity by sodium salicylate in quiescent human fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001 Jun 1 **276**:22 18897-904.

- Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sun W, Gunawan ES, Hori M.** Helicobacter pylori infection induces cyclooxygenase-2 expression in human gastric mucosa. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998 Nov **59:5** 313-6.
- Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, Hori M.** Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 1999 Dec **79:12** 1469-77.
- Schmassmann A, Peskar BM, Stettler C, Netzer P, Stroff T, Flogerzi B, Halter F.** Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *Br J Pharmacol* 1998 Mar **123:5** 795-804.
- Schnitzer TJ, Truitt K, Fleischmann R, Dalgin P, Block J, Zeng Q, Bolognese J, Seidenberg B, Ehrich EW.** The safety profile, tolerability, and effective dose range of rofecoxib in the treatment of rheumatoid arthritis. Phase II Rofecoxib Rheumatoid Arthritis Study Group. *Clin Ther* 1999 Oct **21:10** 1688-702.
- Schnitzer TJ.** Non-NSAID pharmacologic treatment options for the management of chronic pain. *Am J Med* 1998 Jul 27 **105:1B** 45S-52S.
- Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J.** Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol.* 1997 Jun **8:3** 159-66.
- Schreinemachers DM, Everson RB.** Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology.* 1994 Mar **5:2** 138-46.
- Schulze-Koops H, Davis LS, Kavanaugh AF, Lipsky PE.** Elevated cytokine messenger RNA levels in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis suggest different degrees of myeloid cell activation. *Arthritis Rheum* 1997 Apr **40:4** 639-47.
- Schwamer I, Offermanns S, Spicher K, Seifert R, Schultz G.** Differential activation of Gi and Gs proteins by E- and I-type prostaglandins in membranes from the human erythroleukaemia cell line, HEL. *Biochim Biophys Acta* 1995 Feb 16 **1265:1** 8-14.
- Schwartz Z, Gilley RM, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD.** The effect of prostaglandin E2 on costochondral chondrocyte differentiation is mediated by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase C. *Endocrinology* 1998 Apr **139:4** 1825-34.
- Scott LJ, Lamb HM.** Rofecoxib. *Drugs* 1999 Sep **58:3** 499-505; discussion 506-7.
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P.** Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Dec 6 **91:25** 12013-7.
- Seibold SA, Cerda JF, Mulichak AM, Song I, Garavito RM, Arakawa T, Smith WL, Babcock GT.** Peroxidase activity in prostaglandin endoperoxide H synthase-1 occurs with a neutral histidine proximal heme ligand. *Biochemistry* 2000 Jun 6 **39:22** 6616-24.
- Shah AA, Thjodleifsson B, Murray FE, Kay E, Barry M, Sigthorsson G, Gudjonsson H, Oddsson E, Price AB, Fitzgerald DJ, Bjarnason I.** Selective inhibition of COX-2 in humans is associated with less gastrointestinal injury: a comparison of nimesulide and naproxen. *Gut* 2001 Mar **48:3** 339-46.
- Shamoon M, Hochberg MC.** The role of acetaminophen in the management of patients with osteoarthritis. *Am J Med* 2001 Feb 19 **110 Suppl 3A**: 46S-9S.
- Sharma RA, Manson MM, Gescher A, Steward WP.** Colorectal cancer chemoprevention: biochemical targets and clinical development of promising agents. *Eur J Cancer* 2001 Jan **37:1** 12-22.
- Sharon P, Ligumsky M, Rachmilewitz D, Zor U.** Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. *Gastroenterology* 1978 Oct **75:4** 638-40.
- Sheng H, Shao J, Hooton EB, Tsujii M, DuBois RN, Beauchamp RD.** Cyclooxygenase-2 induction and transforming growth factor beta growth inhibition in rat intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ.* 1997 Apr **8:4** 463-70.
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN.** Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998 Jan 15 **58:2** 362-6.
- Shigeta J, Takahashi S, Okabe S.** Role of cyclooxygenase-2 in the healing of gastric ulcers in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998 Sep **286:3** 1383-90.

- Shimokawa T, Kulmacz RJ, DeWitt DL, Smith WL.** Tyrosine 385 of prostaglandin endoperoxide synthase is required for cyclooxygenase catalysis. *J Biol Chem* 1990 Nov 25 **265**:33 20073-6.
- Shimokawa T, Smith WL.** Prostaglandin endoperoxide synthase. The aspirin acetylation region. *J Biol Chem* 1992 Jun 15 **267**:17 12387-92.
- Shinohara H, Balboa MA, Johnson CA, Balsinde J, Dennis EA.** Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A2s. *J Biol Chem* 1999 Apr 30 **274**:18 12263-8.
- Shiota G, Okubo M, Noumi T, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, Yashima K, Kishimoto Y, Kawasaki H.** Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepato gastroenterology* 1999 Jan-Feb **46**:25 407-12.
- Shureiqi I, Chen D, Lee JJ, Yang P, Newman RA, Brenner DE, Lotan R, Fischer SM, Lippman SM.** 15-LOX-1: a novel molecular target of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2000 **92**:14 1136-42.
- Siegel I, Klein T, Backman JT, Saal JG, Nusing RM, Fritz P.** Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human tissue. *Arthritis Rheum* 1998 **41** 122-9.
- Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS.** Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* 2000 Sep 13 **284**:10 1247-55.
- Simmons DL, Botting RM, Robertson PM, Madsen ML, Vane JR.** Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Mar 16 **96**:6 3275-80.
- Simon LS, Lanza FL, Lipsky PE, Hubbard RC, Talwalker S, Schwartz BD, Isakson PC, Geis GS.** Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor: efficacy and safety in two placebo-controlled trials in osteoarthritis and rheumatoid arthritis, and studies of gastrointestinal and platelet effects. *Arthritis Rheum* 1998 Sep **41**:9 1591-602.
- Simon LS, Weaver AL, Graham DY, Kivitz AJ, Lipsky PE, Hubbard RC, Isakson PC, Verburg KM, Yu SS, Zhao WW, Geis GS.** Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999 Nov 24 **282**:20 1921-8.
- Sirois J, Richards JS.** Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *J Biol Chem* 1992 Mar 25 **267**:9 6382-8.
- Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson PC.** Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Oct 27 **95**:22 13313-8.
- Smith RL, Kajiyama G, Lane NE.** Nonsteroidal antiinflammatory drugs: effects on normal and interleukin 1 treated human articular chondrocyte metabolism in vitro. *J Rheumatol.* 1995 Jun **22**:6 1130-7.
- Smith RL, Kajiyama G, Lane NE.** Nonsteroidal antiinflammatory drugs: effects on normal and interleukin 1 treated human articular chondrocyte metabolism in vitro. *J Rheumatol* 1995 Jun **22**:6 1130-7.
- Smith T, McCracken J, Shin YK, DeWitt D.** Arachidonic acid and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce conformational changes in the human prostaglandin endoperoxide H2 synthase-2 (cyclooxygenase-2). *J Biol Chem* 2000 Dec 22 **275**:51 40407-15.
- Smith WL, Bell TG.** Immunohistochemical localization of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am J Physiol* 1978 Nov **235**:5 F451-7.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM.** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000 **69**: 145-82.
- Smith WL, DeWitt DL.** Differential interactions of prostaglandin endoperoxide synthases with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Invest Drugs* 1994 **3**: 1-11.
- Smith WL, DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 1996 **62**: 167-215.

- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996 Dec 27 **271:52** 33157-60.
- Smith WL, Marnett LJ, DeWitt DL.** Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol Ther* 1991 **49:3** 153-79.
- Smith WL.** Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu Rev Physiol* 1986 **48**: 251-62.
- Smith WL.** Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 1992 Aug **263:2 Pt 2** F181-91.
- Somerville K, Faulkner G, Langman M.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bleeding peptic ulcer. *Lancet* 1986 Mar 1 **1:8479** 462-4.
- Song I, Smith WL.** C-terminal Ser/Pro-Thr-Glu-Leu tetrapeptides of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 target the enzymes to the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 1996 Oct 1 **334:1** 67-72.
- Sonnenburg WK, Smith WL.** Regulation of cyclic AMP metabolism in rabbit cortical collecting tubule cells by prostaglandins. *J Biol Chem* 1988 May 5 **263:13** 6155-60.
- Sonnenburg WK, Zhu JH, Smith WL.** A prostaglandin E receptor coupled to a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit cortical collecting tubule cells. *J Biol Chem* 1990 May 25 **265:15** 8479-83.
- Sorbera LA, Leeson P.A., Castaner J., Castaner R.M.** Valdecoxib and parecoxib sodium: analgesic antiarthritic cyclooxygenase-2 inhibitor. *Drugs of the Future* 2001 **26:2** 133-40.
- Spector AA, Gordon JA, Moore SA.** Hydroxyecosatetraenoic acids (HETEs). *Prog Lipid Res* 1988 **27:4** 271-323.
- Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL.** Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 1998 Apr 17 **273:16** 9886-93.
- Spiegelman BM.** PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998 Apr **47:4** 507-14.
- Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, Simmons RL, Evans CH.** Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991 Dec 1 **147:11** 3915-20.
- Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B.** The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 2000 Jun 29 **342:26** 1946-52.
- Steinberg JJ, Sledge CB.** Chondrocyte mediated cartilage degradation: regulation by prostaglandin E2, cyclic AMP and interferon alpha. *J Rheumatol Suppl* 1991 Feb **27**: 63-5.
- Stenke L, Reizenstein P, Lindgren JA.** Leukotrienes and lipoxins--new potential performers in the regulation of human myelopoiesis. *Leuk Res* 1994 Oct **18:10** 727-32.
- Strong P, Coleman RA, Humphrey PP.** Prostanoid-induced inhibition of lipolysis in rat isolated adipocytes: probable involvement of EP3 receptors. *Prostaglandins* 1992 Jun **43:6** 559-66.
- Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins PD, Evans CH.** Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999 Jul **7:4** 377-9.
- Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ.** Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 1996 Oct 1 **56:19** 4424-9.
- Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T, Oida H, Yoshida N, Tanaka T, Katsuyama M, Hasumoto K, Murata T, Hirata M, Ushikubi F, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S.** Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* 1997 Aug 1 **277:5326** 681-3.
- Suzuki T, Fujii Y, Miyano M, Chen LY, Takahashi T, Watanabe K.** cDNA cloning, expression, and mutagenesis study of liver-type prostaglandin F synthase. *J Biol Chem* 1999 Jan 1 **274:1** 241-8.
- Swierkosz TA, Mitchell JA, Warner TD, Botting RM, Vane JR.** Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol* 1995 Apr **114:7** 1335-42.

T

- Takafuji V, Cosme R, Lublin D, Lynch K, Roche JK.** Prostanoid receptors in intestinal epithelium: selective expression, function, and change with inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000 Oct **63**:4 223-35.
- Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T, Hirasawa Y, Lotz M, Amiel D.** Effect of hyaluronan on chondrocyte apoptosis and nitric oxide production in experimentally induced osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2000 Jul **27**:7 1713-20.
- Takano S, Aramaki Y, Tsuchiya S.** Lipoxygenase may be involved in cationic liposome-induced macrophage apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 **288**:1 116-20.
- Taketo MM.** Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst* 1998 Oct 21 **90**:20 1529-36.
- Taketo MM.** Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Natl Cancer Inst* 1998 Nov 4 **90**:21 1609-20.
- Takeuchi K, Araki H, Umeda M, Komoike Y, Suzuki K.** Adaptive gastric cytoprotection is mediated by prostaglandin EP1 receptors: a study using rats and knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2001 Jun **297**:3 1160-5.
- Talley JJ, Bertenshaw SR, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ, Kellogg MS, Koboldt CM, Yuan J, Zhang YY, Seibert K.** N-[[[5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]-phenyl]sulfonyl]propanamide, sodium salt, parecoxib sodium: A potent and selective inhibitor of COX-2 for parenteral administration. *J Med Chem* 2000a May 4 **43**:9 1661-3.
- Talley JJ, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ, Koboldt CM, Masferrer JL, Perkins WE, Rogers RS, Shaffer AF, Zhang YY, Zweifel BS, Seibert K.** 4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]- benzenesulfonamide, valdecoxib: a potent and selective inhibitor of COX-2. *J Med Chem*. 2000b Mar 9 **43**:5 775-7.
- Talley JJ.** Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Prog Med Chem* 1999 **36**: 201-34.
- Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Nakanishi S.** A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 1992 Jan **8**:1 169-79.
- Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I.** Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* 2000 Oct 20 **275**:42 32775-82.
- Tatsuno I, Saito H, Chang KJ, Tamura Y, Yoshida S.** Comparison of the effect between leukotriene B4 and leukotriene B5 on the induction of interleukin 1-like activity and calcium mobilizing activity in human blood monocytes. *Agents Actions*. 1990 Mar **29**:3-4 324-7.
- Tavares IA, Bennett A.** Acemetacin and indomethacin: differential inhibition of constitutive and inducible cyclo-oxygenases in human gastric mucosa and leucocytes. *Int J Tissue React* 1993 **15**:2 49-53.
- Tavares IA, Bishai PM, Bennett A.** Activity of nimesulide on constitutive and inducible cyclooxygenases. *Arzneimittelforschung*. 1995 Oct **45**:10 1093-5.
- Tegeder I, Niederberger E, Israr E, Guhring H, Brune K, Euchenhofer C, Grosch S, Geisslinger G.** Inhibition of NF-kappaB and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen. *FASEB J*. 2001 Mar **15**:3 595-7.
- Terlain B, Jouzeau JY, Abid A, Nedelec E, Netter P.** Isoenzymes de la cyclooxygénase et anti-inflammatoires non stéroïdiens. *La lettre du pharmacologue* 1996 **10** 136-43.
- Terlain B, Planche M, Gillet P, Drelon E, Gegout P, Chevrier D, Jouzeau JY, Netter P.** Méthodes télémétriques et modèles expérimentaux : applications en physiopathologie et en pharmacologie articulaires. In : A Gaucher, P Netter, J Pourel, D Régent, D Mainard, P Gillet editors. *Actualités en physiopathologie et pharmacologie articulaires*. Paris : Masson 1993 :131-139.
- Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE.** Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum*. 2001 Mar **44**:3 585-94.
- Tetsuka T, Daphna Iken D, Miller BW, Guan Z, Baier LD, Morrison AR.** Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1996 May 1 **97**:9 2051-6.

- Thiesen-Popp P, Papeh H, Muller-Peddinghaus R.** Interleukin-6 (IL-6) in adjuvant arthritis of rats and its pharmacological modulation. *Int J Immunopharmacol* 1992 **14**: 565-571.
- Thompkins L, Lee KH.** Studies on the mechanism of action of salicylates. IV. Effect of salicylates on oxidative phosphorylation. *J Pharm Sci* 1969 Jan **58**:1 102-5.
- Thompson HJ, Briggs S, Paranka NS, Piazza GA, Brendel K, Gross PH, Sperl GJ, Pamukcu R, Ahnen DJ.** Inhibition of mammary carcinogenesis in rats by sulfone metabolite of sulindac. *J Natl Cancer Inst* 1995 Aug **16** **87**:16 1259-60.
- Thompson HJ, Jiang C, Lu J, Mehta RG, Piazza GA, Paranka NS, Pamukcu R, Ahnen DJ.** Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 1997 Jan **15** **57**:2 267-71.
- Thoren S, Jakobsson PJ.** Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin H synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur J Biochem* 2000 Nov;**267**:21 6428-34.
- Thornberry NA, Lazebnik Y.** Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug **28** **281**:5381 1312-6.
- Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW.** Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 1993 Mar **15** **53**:6 1322-7.
- Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW.** Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 1991 Dec **5** **325**:23 1593-6.
- Thuresson ED, Lakkides KM, Rieke CJ, Sun Y, Wingerd BA, Micielli R, Mulichak AM, Malkowski MG, Garavito RM, Smith WL.** Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. *J Biol Chem* 2001 Mar **30** **276**:13 10347-57.
- Thuresson ED, Lakkides KM, Smith WL.** Different catalytically competent arrangements of arachidonic acid within the cyclooxygenase active site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 lead to the formation of different oxygenated products. *J Biol Chem* 2000 Mar **24** **275**:12 8501-7.
- Thuresson ED, Malkowski MG, Lakkides KM, Rieke CJ, Mulichak AM, Ginell SL, Garavito RM, Smith WL.** Mutational and X-ray crystallographic analysis of the interaction of dihomo-gamma -linolenic acid with prostaglandin endoperoxide H synthases. *J Biol Chem* 2001 Mar **30** **276**:13 10358-65.
- Tindall EA.** Celecoxib does not affect index joint in osteoarthritis patients with long-term exposure. *Arthritis Rheum* 2000 **43**(Suppl) S224.
- Tocco G, Freire-Moar J, Schreiber SS, Sakhi SH, Aisen PS, Pasinetti GM.** Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 1997 Apr **144**:2 339-49.
- Tomasoni S, Noris M, Zappella S, Gotti E, Casiraghi F, Bonazzola S, Benigni A, Remuzzi G.** Upregulation of renal and systemic cyclooxygenase-2 in patients with active lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1998 Jul **9**:7 1202-12.
- Tomlinson A, Appleton I, Moore AR, Gilroy DW, Willis D, Mitchell JA, Willoughby DA.** Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br J Pharmacol* 1994 Nov **113**:3 693-8.
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM.** mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994 May **15** **8**:10 1224-34.
- Toto RD, Anderson SA, Brown Cartwright D, Kokko JP, Brater DC.** Effects of acute and chronic dosing of NSAIDs in patients with renal insufficiency. *Kidney Int* 1986 Nov **30**:5 760-8.
- Truitt KE, Sperling RS, Ettinger WH Jr, Greenwald M, DeTora L, Zeng Q, Bolognese J, Ehrlich E.** A multicenter, randomized, controlled trial to evaluate the safety profile, tolerability, and efficacy of rofecoxib in advanced elderly patients with osteoarthritis. *Aging (Milano)*. 2001 Apr **13**:2 112-21.
- Truss M, Beato M.** Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 1993 Aug **14**:4 459-79.
- Tsai A, Hsi LC, Kulmacz RJ, Palmer G, Smith WL.** Characterization of the tyrosyl radicals in ovine prostaglandin H synthase-1 by isotope replacement and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1994 Feb **18** **269**:7 5085-91.

Tsai A, Kulmacz RJ, Palmer G. Spectroscopic evidence for reaction of prostaglandin H synthase-1 tyrosyl radical with arachidonic acid. *J Biol Chem* 1995 May 5 **270:18** 10503-8.

Tsubouchi Y, Kawahito Y, Kohno M, Inoue K, Hla T, Sano H. Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 May 18 **283:4** 750-5.

Tsuji M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995 Nov 3 **83:3** 493-501.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998 May 29 **93:5** 705-16.

U

Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 1998 Nov **69:3** 168-72.

Ueno N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, Urade Y, Kudo I. Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2. *J Biol Chem* 2001 Sep 14 **276:37** 34918-27.

Unangst PC, Connor DT, Cetenko WA, Sorenson RJ, Kostlan CR, Sircar JC, Wright CD, Schrier DJ, Dyer RD. Synthesis and biological evaluation of 5-[[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]methylene]oxazoles, -thiazoles, and -imidazoles: novel dual 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors with antiinflammatory activity. *J Med Chem* 1994 Jan 21 **37:2** 322-8.

Ushikubi F, Hirata M, Narumiya S. Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995 Oct **12:2-3** 343-59.

Ushikubi F, Nakamura K, Narumiya S. Functional reconstitution of platelet thromboxane A2 receptors with Gq and Gi2 in phospholipid vesicles. *Mol Pharmacol* 1994 Nov **46:5** 808-16.

Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 1998 Sep 17 **395:6699** 281-4.

V

Vaananen PM, Keenan CM, Grisham MB, Wallace JL. Pharmacological investigation of the role of leukotrienes in the pathogenesis of experimental NSAID gastropathy. *Inflammation* 1992 Jun **16:3** 227-40.

Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet* 1999 Jul 10 **354:9173** 141-8.

Van den Berg WB, Kruijtsen MWM, Van de Putte LBA. The mouse patella assay : an easy method of quantitating articular cartilage chondrocyte function in vivo and in vitro. *Rheumatol. Int* 1982 **1**: 165-169.

van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van den Berg WB. Proteoglycan synthesis and osteophyte formation in 'metabolically' and 'mechanically' induced murine degenerative joint disease: an in-vivo autoradiographic study. *Int J Exp Pathol.* 1992 Jun **73:3** 335-50.

van der Kraan PM, Vitters EL, van de Putte LB, van den Berg WB. Development of osteoarthritic lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joints. *Am J Pathol.* 1989 Dec **135:6** 1001-14.

Van Hecken A, Schwartz JI, Depre M, De Lepeleire I, Dallob A, Tanaka W, Wynants K, Buntinx A, Arnout J, Wong PH, Ebel DL, Gertz BJ, De Schepper PJ. Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2000 Oct **40:10** 1109-20.

Van Snick J. From hybridoma and plasmacytoma growth factors to interleukin 6. *Contrib Microbiol Immunol* 1989 **11**: 73-95.

Vane J. Towards a better aspirin. *Nature* 1994 Jan 20 **367:6460** 215-6.

Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol Suppl* 1996 **102**: 9-21.

Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Mar 15 **91:6** 2046-50.

Vane JR, Warner TD. Nomenclature for COX-2 inhibitors. *Lancet*. 2000 Oct 21 **356:9239** 1373-4.

Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971 Jun 23 **231:25** 232-5.

Versteeg HH, van Bergen en Henegouwen PM, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Cyclooxygenase-dependent signalling: molecular events and consequences. *FEBS Lett* 1999 Feb 19 **445:1** 1-5.

Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, Masferrer JL. Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. *Hypertension* 1997 Sep **30:3 Pt 2** 687-92.

Von Euler US. On the specific vasodilating and pain muscle stimulating substance from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J. Physiol* 1936 **88**: 213-34.

W

Wadleigh DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S, Herschman HR. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 2000 Mar 3 **275:9** 6259-66.

Wakitani K, Tazaki H, Matsushita M, Iwamura H. JTE-522 selectively inhibits cyclooxygenase-2-derived prostaglandin production in inflammatory tissues. *Inflamm Res* 2000 Mar **49:3** 117-22.

Wallace JL, Bak A, McKnight W, Asfaha S, Sharkey KA, MacNaughton WK. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. *Gastroenterology* 1998 Jul **115:1** 101-9.

Wallace JL, Carter L, McKnight W, Tries S, Laufer S. ML 3000 reduces gastric prostaglandin synthesis without causing mucosal injury. *Eur J Pharmacol*. 1994 Dec 27 **271:2-3** 525-31.

Wallace JL, Carter L, McKnight W, Tries S, Laufer S. ML 3000 reduces gastric prostaglandin synthesis without causing mucosal injury. *Eur J Pharmacol*. 1994 Dec 27 **271:2-3** 525-31.

Wallace JL, Keenan CM, Cucala M, Mugridge KG, Parente L. Mechanisms underlying the protective effects of interleukin 1 in experimental nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* 1992 Apr **102:4 Pt 1** 1176-85.

Wallace JL, Keenan CM, Gale D, Shoupe TS. Exacerbation of experimental colitis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is not related to elevated leukotriene B4 synthesis. *Gastroenterology* 1992 Jan **102:1** 18-27.

Wallace JL, McKnight GW, Bell CJ. Adaptation of rat gastric mucosa to aspirin requires mucosal contact. *Am J Physiol*. 1995 Jan **268:1 Pt 1** G134-8.

Wallace JL, McKnight W, Del Soldato P, Baydoun AR, Cirino G. Anti-thrombotic effects of a nitric oxide-releasing, gastric-sparing aspirin derivative. *J Clin Invest* 1995 Dec **96:6** 2711-8.

Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* 2000 Sep **119:3** 706-14.

Wallace JL, Reuter BK, McKnight W, Bak A. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: are they really effective, selective, and GI-safe? *J Clin Gastroenterol* 1998 **27 Suppl 1**: S28-34.

Wallace JL, Whittle BJ, Boughton Smith NK. Prostaglandin protection of rat colonic mucosa from damage induced by ethanol. *Dig Dis Sci* 1985 Sep **30:9** 866-76.

Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology* 1997 Mar **112:3** 1000-16.

Wallace JL. Selective COX-2 inhibitors: is the water becoming muddy? *Trends Pharmacol Sci* 1999 Jan **20:1** 4-6.

Wallberg Jonsson S, Cederfelt M, Rantapaa Dahlqvist S. Hemostatic factors and cardiovascular disease in active rheumatoid arthritis: an 8 year followup study. *J Rheumatol* 2000 Jan **27:1** 71-5.

Wallberg Jonsson S, Ohman ML, Dahlqvist SR. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. *J Rheumatol* 1997 Mar **24:3** 445-51.

- Wang JL, Cheng HF, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC.** Selective increase of cyclooxygenase-2 expression in a model of renal ablation. *Am J Physiol* 1998 Oct **275:4 Pt 2** F613-22.
- Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR.** Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jun 22 **96:13** 7563-8.
- Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S, Narumiya S, Ichikawa A.** Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* 1993 Sep 25 **268:27** 20175-8.
- Watanabe K, Yoshida R, Shimizu T, Hayaishi O.** Enzymatic formation of prostaglandin F2 alpha from prostaglandin H2 and D2. Purification and properties of prostaglandin F synthetase from bovine lung. *J Biol Chem* 1985 Jun 10 **260:11** 7035-41.
- Watanabe T, Nakao A, Emerling D, Hashimoto Y, Tsukamoto K, Horie Y, Kinoshita M, Kurokawa K.** Prostaglandin F2 alpha enhances tyrosine phosphorylation and DNA synthesis through phospholipase C-coupled receptor via Ca(2+)-dependent intracellular pathway in NIH-3T3 cells. *J Biol Chem.* 1994 Jul 1 **269:26** 17619-25.
- Waxman DJ, Dannan GA, Guengerich FP.** Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochemistry* 1985 Jul 30 **24:16** 4409-17.
- Wheeler MA, Yoon JH, Olsson LE, Weiss RM.** Cyclooxygenase-2 protein and prostaglandin E(2) production are up-regulated in a rat bladder inflammation model. *Eur J Pharmacol* 2001 Apr 13 **417:3** 239-48.
- Whelton A, Schulman G, Wallemark C, Drower EJ, Isakson PC, Verburg KM, Geis GS.** Effects of celecoxib and naproxen on renal function in the elderly. *Arch Intern Med* 2000 May 22 **160:10** 1465-70.
- Whelton A.** Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. *Am J Med* 1999 May 31 **106:5B** 13S-24S.
- Whittle BJ, Higgs GA, Eakins KE, Moncada S, Vane JR.** Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature* 1980 Mar 20 **284:5753** 271-3.
- Whittle BJ.** Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology* 1981 Jan **80:1** 94-8.
- Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA.** Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 1996 Jan **2:1** 87-90.
- Willoughby DA, Moore AR, Colville Nash PR.** COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 2000 Feb 19 **355:9204** 646-8.
- Wilson DE, Kaymakalan H.** Prostaglandins: gastrointestinal effects and peptic ulcer disease. *Med Clin North Am.* 1981 Jul **65:4** 773-87.
- Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ.** Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998 Jul 15 **58:14** 2929-34.
- Wittenberg RH, Willburger RE, Kleemeyer KS, Peskar BA.** In vitro release of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissue, cartilage, and bone in degenerative joint diseases. *Arthritis Rheum* 1993 Oct **36:10** 1444-50.
- Wojtulewski JA, Schattenkirchner M, Barcelo P, Le Loet X, Bevis PJ, Bluhmki E, Distel M.** A six-month double-blind trial to compare the efficacy and safety of meloxicam 7.5 mg daily and naproxen 750 mg daily in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1996 Apr **35 Suppl 1**: 22-8.
- Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G.** Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med.* 1999 Jun 17 **340:24** 1888-99.
- Wong A, Hwang SM, Cook MN, Hogaboom GK, Croke ST.** Interactions of 5-lipoxygenase with membranes: studies on the association of soluble enzyme with membranes and alterations in enzyme activity. *Biochemistry* 1988 Sep 6 **27:18** 6763-9.

Wong BC, Wang WP, Cho CH, Fan XM, Lin MC, Kung HF, Lam SK. 12-lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 2001 22:9 1349-54.

Wong E, Bayly C, Waterman HL, Riendeau D, Mancini JA. Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2-selective inhibitors by a double His513 --> Arg and Ile523 --> val mutation. *J Biol Chem* 1997 Apr 4 272:14 9280-6.

Wong K, Freund K. Inhibition of the n-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine induced respiratory burst in human neutrophils by adrenergic agonists and prostaglandins of the E series. *Can J Physiol Pharmacol* 1981 Sep 59:9 915-20.

Wong S, Lee SJ, Frierson MR, Proch J, Miskowski TA, Rigby BS, Schmolka SJ, Naismith RW, Kreutzer DC, Lindquist R. Antiarthritic profile of BF-389--a novel anti-inflammatory agent with low ulcerogenic liability. *Agents Actions* 1992 Sep 37:1-2 90-8.

Wu KK, Sanduja R, Tsai AL, Ferhanoglu B, Loose Mitchell DS. Aspirin inhibits interleukin 1-induced prostaglandin H synthase expression in cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Mar 15 88:6 2384-7.

X

Xiao G, Chen W, Kulmacz RJ. Comparison of structural stabilities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1998 Mar 20 273:12 6801-11.

Xie W, Herschman HR. v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. *J Biol Chem* 1995 Nov 17 270:46 27622-8.

Xie W, Merrill JR, Bradshaw WS, Simmons DL. Structural determination and promoter analysis of the chicken mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase gene and genetic mapping of the murine homologue. *Arch Biochem Biophys* 1993 300 247-52.

Xie W, Robertson DL, Simmons DL. Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Dev Res* 1992 25 249-65.

Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Apr 1 88:7 2692-6.

Y

Yaksh TL. Regulation of spinal nociceptive processing: where we went when we wandered onto the path marked by the gate. *Pain*. 1999 Aug Suppl 6 S149-52.

Yamada H, Kikuchi T, Nemoto O, Obata K, Sato H, Seiki M, Shinmei M. Effects of indomethacin on the production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1996 Oct 23:10 1739-43.

Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. *Brain Res*. 1996 Nov 11 739 :1-2 104-10.

Yeomans ND, Tulassay Z, Juhasz L, Racz I, Howard JM, van Rensburg CJ, Swannell AJ, Hawkey CJ. A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Acid Suppression Trial: Ranitidine versus Omeprazole for NSAID-associated Ulcer Treatment (ASTRONAUT) Study Group. *N Engl J Med* 1998 Mar 12 338:11 719-26.

Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 1998 Nov 5 396:6706 77-80.

Yip Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall MS, Sweeney CJ. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2000 Feb 21:2 139-46.

Yokoyama C, Tanabe T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 Dec 15 165:2 888-94.

Young JM, Panah S, Satchawatcharaphong C, Cheung PS. Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B2 production. *Inflamm Res* 1996 May 45:5 246-53.

Z

Ziegler J. Cancer and arthritis share underlying processes. *J Natl Cancer Inst* 1998 Jun 3 **90:11** 802-3.

Zimmermann KC, Sarbia M, Schror K, Weber AA. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol* 1998 Sep **54:3** 536-40.

Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999 Jan 1 **59:1** 198-204.

Annexes



Fundamental & Clinical Pharmacology

INCLUDING THE FORMER ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHARMACODYNAMIE ET DE THÉRAPIE

VOL. 13/No. 3

1999

FCPHEZ 13 (3) 293-436
ISSN 0767-3981

THE INTERNATIONAL PUBLICATION OF THE FRENCH PHARMACOLOGICAL SOCIETY
THE OFFICIAL JOURNAL OF EPHAR, THE FEDERATION OF THE EUROPEAN PHARMACOLOGICAL SOCIETIES

EFFECT OF MELOXICAM ON JOINT FUNCTIONALITY AND PATELLAR CARTILAGE IN ADJUVANT ARTHRITIS

C. Boileau, L. Philippe, E. Nédelec, H. Blain, P. Gillet, B. Terlain, P. Netter & J.-Y. Jouzeau

Laboratoire de Pharmacologie & UMR CNRS-UHP 7561, Faculté de Médecine, 54505 Vandœuvre lès-Nancy, France

Aim: To compare the efficacy of meloxicam (MLX, preferential COX-2 inhibitor) and naproxen (NPX, non selective COX inhibitor), on both classical and biotelemetric inflammatory parameters and cartilage damage during adjuvant arthritis. **Methods:** Lewis rats, sensitized with FCA (1 mg of *Mycobacterium tuberculosis H37Ra*), were treated orally with either 0.1, 0.3, 1 or 3 mg/kg/d of MLX [once] or 3, 10 or 30 mg/kg/d of NPX [bid]. Rats were assessed for severity of arthritis (clinical score, hindpaw oedema), nocturnal body temperature and locomotor activity (biotelemetry) over 21 days whereas others (n=6/group) were regularly killed (D2, D7, D12, D16 or D21) and checked for cartilage anabolism ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ incorporation), circulating IL-6 and TxB₂ levels and PGE₂ contents in gastric mucosa (g.m.) and inflamed hindpaw (i.h.). **Results:** Biotelemetry showed biphasic profiles of fever and locomotor activity: early acute phase (D1-4), late spreading phase (over D13). NSAIDs acted differently: equipotency on fever peaks ($\text{ID}_{50\%} = 5$ to 6 mg/kg/d) for NPX, time-dependent potency ($\text{ID}_{50\%} = 0.3$ mg/kg/d [D13] vs 4.8 mg/kg/d [D1]) for MLX. Similar difference was noted on hypomobility: $\text{ED}_{20} = 11.7$ mg/kg/d [$\text{AUC}_{\text{D0-D4}}$] to 3.5 mg/kg/d [$\text{AUC}_{\text{D5-D21}}$] for NPX, main efficacy on late phase ($\text{ED}_{20} = 1.6$ mg/kg/d [$\text{AUC}_{\text{D5-D21}}$]) for MLX. ED_{50} s on uninjected hindpaw oedema were 0.2 mg/kg/d for MLX and 6.8 mg/kg/d for NPX at D21. No toxicity was observed on patellar cartilage anabolism and MLX 3 mg/kg/d showed some protective effect (D12 to D16). Ratio of PGE₂ contents (i.h./g.m.) showed that NSAIDs distinguished from one another with time ($R_{\text{in/gm}} = 0.2$ for MLX vs ≥ 2 for NPX at D21). For both NSAIDs, inhibition profile of TxB₂ levels (clotting time) did not match closely this of PGE₂ content in gastric mucosa. **Conclusion:** MLX and NPX exhibit different patterns of efficacy and COX selectivity in the course of polyarthritis, which could result from pharmacokinetics differences and/or possible distinct effects on cell activation during the immunological spreading.

SFP 2002 – RENNES April 8-10, 2002

ABSTRACT FORM

Deadline for submission: December 18, 2001

Sample to show style:

Binding of pharmacological results to cloned abstract forms

V. Rapamil, A. Denosine, and P. Nicilline. National Institute of Pharmacology, 75000 Paris, France.

Specific binding of pharmacological results to on-line abstract forms has not been widely studied. Thus, pharmacological results were radiolabelled with ¹²⁵I and incubated in the presence of 10¹¹ cloned SFP forms expressed in recombinant FCP cells. Results demonstrate that specific binding markedly increased by strict respect of the instruction for submission of the.....

Use only 12 points Times or Times New Roman fonts. Do not alter the size or position of the abstract frame.

Abstracts submitted with fonts less than 12 points in size, with modified frames or not conforming to the style shown above, or abstracts submitted after December 18 will be rejected

Click in the frame below to enter your abstract

Effect of a selective COX-2 inhibitor on cartilage lesions and chondrocyte apoptosis during experimental osteoarthritis in rat

C. Boileau, H. Dumond, N. Presle, S. Etienne, P. Gegout-Pottie, B. Terlain, P. Netter & J-Y. Jouzeau. UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Aim: To investigate the consequence of a selective inhibition of COX-2 on the severity of osteoarthritic (OA)-like lesions induced by injection of monoiodoacetate (MIA) in rat. **Methods:** OA of the knee was induced bilaterally by *i.a.* injection of 0.03 mg of MIA in 50 µl sterile saline. Rofecoxib (RFX), a selective COX-2 inhibitor, was given orally at 0.75 and 3 mg/kg/d *once* whereas naproxen (NPX), a non-selective NSAID, was given at 10 mg/kg/d *bid* from day of MIA injection (D0). Animals were killed at D10, D15 or D20 and knee joints were processed for histological and immunohistochemical analyses of OA severity, COX-2 & iNOS, apoptosis (Tunel, activated caspase-3). Data were % of positive cells in perilesional cartilage areas. Proteoglycan (PG) synthesis was measured *ex vivo* in patellar cartilage using ³⁵S incorporation. **Results:** Changes in PG synthesis induced by MIA were not affected by NSAID treatment. OA lesions were maximal at D15 while chondrocyte death was increased maximally at D10. Apoptosis was overestimated by Tunel reaction compared to caspase-3 detection, with major changes in superficial layers of cartilage. COX-2 and iNOS were overexpressed only at D10 & D15 in superficial zone of cartilage. Treatment with RFX or NPX did not modify neither the severity of OA lesions, nor the level of apoptosis. In contrast, RFX 3 reduced transiently COX-2 expression on D10 and iNOS expression on D15. **Conclusion:** In our experimental conditions: *i)* NSAIDs were chondroneutral on OA cartilage; *ii)* RFX was well tolerated at a high dose; *iii)* selective COX-2 inhibition was not pro-apoptotic in cartilage. (supported by a grant from the EU Community [QLRT-02072])

Limitation of the *in vitro* whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use

Hubert Blain,^{1,3} Christelle Boileau,¹ Françoise Lopicque,¹ Emmanuelle Nédélec,¹ Damien Lœuille,^{1,2} Cécile Guillaume,¹ Alain Gaucher,² Claude Jeandel,³ Patrick Netter¹ & Jean-Yves Jouzeau¹

¹Département de Pharmacologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire, UMR 7561, Centre National de la Recherche Scientifique-Université Henri Poincaré Nancy 1, Vandœuvre lès Nancy, ²Service de Rhumatologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nancy and ³Service de Médecine Inténe et de Gérologie, Centre Hospitalier Antonin Balmes, Montpellier, France

λ (NSAIDs)

Aims To assess if the inhibitory potency of nonsteroidal anti-inflammatory drugs λ on cyclooxygenase (COX) isoenzymes, when given therapeutically in humans, can be predicted from their *in vitro* concentration-response curves using the whole blood assay.

Methods Twenty-four healthy male volunteers aged 20–27 years were recruited. Inhibition of blood COX isoenzymes was determined *in vitro* before any drug intake and *ex vivo* after single and repeated intake of either 7.5 mg meloxicam once, 400 mg ibuprofen three times daily or 75 mg diclofenac SR once, taken in a randomized cross-over design. Production of thromboxane B₂ (TXB₂) during clotting and of prostaglandin E₂ (PGE₂) during endotoxin exposure served as indicators of platelet COX-1 and monocyte COX-2 activity, respectively. Drugs were determined in plasma by h.p.l.c., with a chiral separation of ibuprofen and free fractions after equilibrium dialysis.

Results Intra-subject variation for COX-1 and COX-2 at baseline was at 26% λ (18%) and 18% λ (13%) respectively, and intersubject variation at 39% and 36%, respectively. The ratios of IC₅₀s and, at best, of IC₈₀s revealed diclofenac and meloxicam as selective COX-2 inhibitors and ibuprofen as a preferential COX-1 inhibitor *in vitro*. However, after oral intake, ibuprofen inhibited *ex vivo* COX-2 by 80% whereas diclofenac inhibited COX-1 by 70%. Meloxicam inhibited COX-1 from 30 to 55% depending on the repetition of the dose and increase in plasma concentrations. Using *in vitro* dose-response curves, the *in vivo* inhibitory potency of diclofenac was estimated adequately from its circulating concentration ([–0.18, 0.21] for COX-1 and [–0.13, –0.03] for COX-2) but this was not the case for ibuprofen on COX-2 ([–0.14, 0.27]) and meloxicam on COX-1 ([0.31, 1.05]). The limited predictability of the system was not improved through considering the unbound fraction of the drugs or the variable chiral inversion of ibuprofen.

Conclusions Assessment of COX-2 selectivity based on *in vitro* studies and pharmacological modelling has a limited clinical relevance. There is a need to investigate COX selectivity at therapeutic plasma concentrations of NSAIDs using the *ex vivo* whole blood assay.

Keywords: COX isoenzymes, enantioselectivity, NSAIDs, protein binding, whole blood assay

// λ \pm
// λ \pm

Introduction

The widely accepted mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is to inhibit the conversion of arachidonic acid (AA) into cyclic endoperoxides by the enzyme cyclooxygenase (COX, prostaglandin

Correspondence: Dr Patrick Netter, UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine, Avenue de la forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. E-mail: patrick.netter@medecine.uhp-nancy.fr

Received 5 June 2001, accepted 25 October 2001.

endoperoxide synthase, PGHS) [1]. Since this last decade, we know that COX exists in at least two isoforms, COX-1 and COX-2, encoded by separate genes and thought to participate differently in physiological situations and disease processes [2, 3]. This new dichotomy, between the 'mostly physiological' COX-1 and the 'mostly pathological' COX-2, has generated a lot of studies comparing NSAIDs for their ability to inhibit both COX enzymes [4, 5]. A variety of *in vitro* enzyme and cell-based assay models have been developed for that purpose and to guide the discovery of new molecules [4, 5], based on the assumption that a marked inhibition of COX-2 without any significant inhibition of COX-1 may characterize NSAIDs with an improved side-effect profile [6]. In these systems, the selectivity of NSAIDs on COX activity is determined generally by the ratio of their IC_{50} (concentration of the drug inhibiting enzyme activity by 50%) values for COX-1 and COX-2 [4, 5, 7]. As a consequence, NSAIDs were classified by their relative potency on cyclooxygenase isoenzymes rather than by their chemical structure [8], although this new classification was mainly based on *in vitro* data collected from miscellaneous biological systems [8]. Unfortunately, each *in vitro* assay system has clear advantages but also certain drawbacks, inherent to the system itself, *i.e.* its clinical relevance [9], or related to the way the system has been manipulated, *i.e.* the experimental conditions used (reviewed in [7, 10]).

In an effort to be closer from the therapeutic use of NSAIDs, an extended classification of cyclooxygenase inhibitors has been proposed, considering the level of COX inhibition at pharmacologically relevant doses in animal models and humans, in addition to enzymatic or biochemical assays [11]. From that point of view, the whole blood assay using thromboxane B_2 (TXB₂) production during clotting, as an index of platelet COX-1 activity to endogenously formed thrombin, and prostaglandin E_2 (PGE₂) production during LPS stimulation, as an index of leucocytes COX-2 expression to bacterial endotoxins [12], has become a widely accepted system [13]. For *in vitro* pharmacological studies, this assay takes advantage of using whole cells that are pathophysiological targets for NSAIDs, of considering the intracellular transport of drugs, of providing a physiological plasma protein level and of checking for inhibition of both COX enzymes on a single sample [10]. Of primary importance for estimating the selectivity of NSAIDs towards COX enzymes, the whole blood assay can also be used to determine the degree of COX inhibition *in vivo* after an oral intake of therapeutic doses of the drug [12, 14]. As a close correlation has been reported between the inhibitory potency of NSAIDs on thromboxane synthesis by platelets and COX-1 activity in gastric mucosa [15], such *ex vivo* assay has a clear clinical relevance

as long as the tissular concentrations of the drug are considered.

As an *in vitro* assay is easy to perform and spares time in comparison to clinical studies, authors have proposed to use the *in vitro* whole blood data for estimating the expected levels of COX inhibition from the circulating levels of NSAIDs [10, 12]. Such predicting approach is based on: (i) the use of COX inhibition curves obtained by the addition of a range concentration of NSAIDs to donated blood from few healthy subjects; (ii) the extrapolation of plasma concentrations into whole blood concentrations of drugs, assuming that NSAIDs do not enter red cells and that haematocrit is 45% [10, 12]. However, it has been underlined recently that the *ex vivo* whole blood assay is somewhat variable and that the level of COX inhibition depends clearly on the pharmacokinetics of NSAIDs [11]. As a consequence, an appropriate number of subjects might be required for a meaningful determination of NSAIDs selectivity [11] and COX inhibition should be reported at pharmacologically relevant times [14, 16] instead of an arbitrary time following drug administration [17].

In the present study, we investigated whether the data obtained with the *in vitro* whole blood assay provided an accurate estimation of the COX selectivity of NSAIDs in clinical use. For that purpose, we enrolled a sufficient number of healthy volunteers to establish the *in vitro* COX response curves of ibuprofen, diclofenac or meloxicam, chosen as non selective to COX-2 selective inhibitors, respectively [13]. We compared, subsequently, the levels of COX inhibition anticipated from these *in vitro* assays to the levels measured *ex vivo* in the same subjects after a single or a repeated oral intake of the drugs. Finally, as protein binding and drug metabolism may vary in pathological situations as inflammation, we investigated the predicting value of the free concentration of NSAIDs and, in the case of ibuprofen, the possible contribution of chiral inversion.

Methods

Subjects

Twenty-four male volunteers (age, 23 ± 2 years; height, 1.80 ± 0.08 m; mean \pm s.d.) were enrolled in this study. Subjects were within 20% of ideal (Metropolitan Life Insurance tables) body-weight (mean weight, 68.8 kg; weight range, 52.0–96.0 kg) and generally healthy, based on physical examination and routine laboratory screening. Subjects with acute or chronic diseases, medical history of gastrointestinal ulcers or allergy against NSAIDs were not included. Subjects were not permitted to receive any other medication (including aspirin or NSAIDs) for 2 weeks before and throughout the duration of the study.

The study was approved by the Ethics Committee of Nancy (Nancy, France). Written informed consent was obtained from all study participants.

In vitro study

The effects of meloxicam (Boehringer Ingelheim, Biberach, Germany), ibuprofen (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) and diclofenac (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) on platelet COX-1 and monocyte COX-2 activities were assessed after incubating increasing concentrations of each NSAID with peripheral whole blood samples drawn from all subjects. Drugs were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) and transferred into test tubes as 5 μ l aliquots to provide final concentrations of NSAID ranging from 10^{-4} M to 10^{-9} M after addition of whole blood.

COX-1 activity was determined as previously described [12]. Briefly, fresh blood was collected from all volunteers, before any drug intake, into vacutainers containing no anticoagulants. Whole blood aliquots of 1 ml were immediately transferred into nonsiliconized glass tubes preloaded with DMSO alone or NSAID and allowed to clot for 1 h at 37°C. Serum was separated by centrifugation at 2000 rev min⁻¹ for 10 min and stored at -80°C until assay. Serum TXB₂ levels were determined with an immunoassay kit according to the manufacturer's procedure (Cascade Biochem Limited, Bershire, UK).

COX-2 activity was determined as previously described [12]. Briefly, whole blood drawn from the same donors was immediately divided into 1 ml aliquots in test tubes containing 10 IU of sodium heparin (Choay, France) and 10 μ g of aspirin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). After a 15 min incubation at 37°C to allow aspirin to inactivate irreversibly platelet COX-1, blood aliquots were further incubated for 24 h at 37°C in the presence or absence of 10 μ g ml⁻¹ LPS, derived from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), and NSAID or vehicle alone (DMSO). Plasma was separated by centrifugation at 2000 rev min⁻¹ for 10 min and stored at -80°C until assay. Plasma PGE₂ levels were determined with an immunoassay kit according to the manufacturer's procedure (Cascade Biochem Limited, Bershire, UK).

Ex vivo study

All volunteers received randomly in a cross-over design 7.5 mg meloxicam (Mobic[®], Boehringer Ingelheim, Paris, France) once for 5 days, 400 mg ibuprofen (Brufen[®], Knoll, Levallois-Perret, France) three times daily for 3 days or 75 mg of diclofenac SR (Voltarène[®], Novartis, Rueil-Malmaison, France) once for 3 days. Drug

regimens, corresponding to half of the maximal recommended dosages [18–20], were chosen to mimic the clinical practice even if lower doses of NSAIDs would probably have help to define more precisely their *in vivo* selectivity. Study duration was about 24 weeks and treatments were separated by adapted wash-out periods of minus 7 days after meloxicam and 2 days after ibuprofen or diclofenac.

Intake of meloxicam or diclofenac was at 08.30 h and intake of ibuprofen was at 09.00 h, noon and 20.00 h with a light meal. Drug intake was controlled by telephone and absence of occult intake of NSAID was confirmed by chromatographic analysis as described below. Peripheral venous blood samples were drawn before any drug administration and after a single or a repeated intake of NSAID. Sampling times allowed each NSAID to enter the circulation importantly [18–20]: 5.5 h after meloxicam, 2.5 h after ibuprofen and 3.5 h after diclofenac. Samples were assessed for TXB₂ and PGE₂ production in whole blood, as described above, and relative changes after drug intake were expressed as percentage of predose levels. Blood samples were also used for the determination of NSAIDs concentration in plasma.

C-reactive protein and creatinine serum levels, liver function tests, platelets and blood cells counts were controlled throughout the study.

Plasma drug concentrations

Total plasma concentrations of meloxicam, diclofenac and racemic ibuprofen were determined by high-performance liquid chromatography (h.p.l.c.) as described elsewhere with minor modifications [21]. The h.p.l.c. system consisted of a Model 510 pump, a Model 486 variable wavelength u.v. detector and a computer loaded with the Millennium software, all from Waters Associates (St Quentin en Yvelines, France). Briefly, plasma or serum samples (200 μ l) were added with 1 μ g of (benzoyl-4-phenyl)-2-butyric acid (Specia, Vitry, France) as internal standard, then extracted with diethyl ether (3 ml) after acidification with 1 M hydrochloric acid (0.1 ml). After evaporation under a nitrogen stream, the dry residues were dissolved in 100 μ l of the mobile phase (acetonitrile-0.3% acetic acid [50:50, v/v]) and chromatographed isocratically in the following conditions: 100 \times 8 mm internal diameter reversed-phase Radial Pak C₁₈ end-capped column enclosed in a RCM-10 compression module (Waters), 1 ml min⁻¹ of flow rate, peak detection at 230 nm for diclofenac, 280 nm for ibuprofen and 360 nm for meloxicam.

In the case of ibuprofen, R- and S-enantiomers were evaluated using the same methodology with the following modifications. The dry residues were derivatized, as described previously for ketoprofen [22] by adding 100 μ l

of 50 mM triethylamine in acetonitrile, then 50 μ l of 60 mM ethyl chloroformate (Merck) in acetonitrile for 30 s followed by 50 μ l of 1 M L-leucinamide in 1 M triethylamine in methanol for 2 min at room temperature. The reaction was stopped by addition of 50 μ l distilled water. Derivatized samples were then eluted isocratically using the following mobile phase (Na_2HPO_4 50 mM-acetonitrile-triethylamine [58:42:0.02, v/v], where pH was adjusted at 7.0 with orthophosphoric acid) and enantiomers were detected at 223 nm.

The total plasma concentration of NSAIDs was determined both in the *ex vivo* and the *in vitro* study. For the later, the chromatographic measurement of drugs added exogenously served to assess the ability of NSAIDs to partition in blood cells. Due to the limits of detection of the chromatographic method, plasma NSAIDs concentrations were detected over 10^{-6} M only and the mean correcting factor calculated on the three highest doses was subsequently applied to the entire concentration range. If NSAIDs did not enter into red cells, the following dividing factor [$100/(100-\text{haematocrit})$] had to be used for transforming whole blood into plasma concentrations.

Protein binding

Unbound fractions of NSAIDs were determined by equilibrium dialysis with subsequent h.p.l.c. analysis. Equilibrium dialysis was performed on a Dianorm apparatus (Braun ScienceTec, Les Ulis, France), equipped with 1 ml cells and Spectrapor 2 membranes (cut-off 12–14 kDa), at 37°C in a thermostat-controlled bath. Samples (1 ml) were dialysed for 3 h against 1 ml of 67 mmol l^{-1} phosphate buffer pH 7, a time sufficient to reach equilibration for each NSAID. Samples collected *ex vivo* after ibuprofen intake and samples added *in vitro* with NSAIDs were analysed after a subsequent addition of 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of either diclofenac, meloxicam or racemic ibuprofen.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm s.d. or s.e. mean when specified. Inhibition of whole blood TXB_2 and PGE_2 production by NSAIDs was calculated as the percentage of baseline levels in the same patient. The inhibition of COXs was modelled using the following equation mathematically analogous to the Hill function: $Y = [a - d / (1 + (X/c)^b)] + d$, where X and Y represent the molar concentration of NSAID and the percentage of inhibition, respectively; a, b, c and d are the parameters of the equation [23]. Fitting of the experimental data to this model was carried out by minimization of the objective function, defined as the sum of square deviations between predicted and experimental response. The best fit was with a weight at $1/Y$. This equation was used

to fit the sigmoidal concentration-response curves and to estimate the IC_{50} and IC_{80} values from the values of the parameters. Fitting was made with all drugs, both for each patient and for mean curves, allowing to calculate individual and mean ICs for COX-1 and COX-2.

Having excluded a sequence or carry-over effects by a multivariate ANOVA, the *ex vivo* whole blood data were combined regardless of the treatment sequence. For each NSAID, statistical comparisons (plasma drug concentration, COX inhibition) between single and repeated intake were done using the Student's paired *t*-test. The statistical level of significance was chosen at 5%.

Based on the individual fitting of COXs inhibition in whole blood and the determination of a plasma-to-whole blood correcting factor for each NSAID, *in vitro* sigmoidal concentration-response curves were reconstructed for plasma NSAIDs concentration. Using these plasma concentration-COXs inhibition curves and the circulating levels of NSAIDs measured after single and repeated intake, we determined the theoretical levels of COX-1 and COX-2 inhibition. These theoretical levels of COXs inhibition were calculated on individual and mean concentration-response curves. Their comparison with the level of COX inhibition really observed *ex-vivo* was performed using the 95% confidence interval of the centred relative difference [(theoretical-observed)/observed] to the interval $[-0.25, +0.25]$ chosen for statistical significance.

Results

In vitro study

Plasma PGE_2 and serum TXB_2 averaged 77.2 ± 28.4 ng ml^{-1} (mean \pm s.d., $n=24$) and 391.2 ± 152.6 ng ml^{-1} , respectively, at baseline. Intra-subject coefficients of variation, determined on three different measurements of basal COX activities (before each treatment phase of the clinical study), averaged $18 \pm 13\%$ for PGE_2 and $26 \pm 18\%$ for TXB_2 . The mean IC_{50} values for COX-1 and COX-2 calculated from the individual dose-response curves (individual IC_{50}) showed that ibuprofen inhibited COX-1 more efficiently than COX-2 ($\text{IC}_{50}\text{COX-2}/\text{COX-1}=3.3$) whereas diclofenac and meloxicam inhibited COX-2 with a higher potency than COX-1 ($\text{IC}_{50}\text{COX-2}/\text{COX-1}=0.16$ and 0.23 , respectively) (Table 1). Similar data were obtained from the mean dose-response curves showing $\text{IC}_{50}\text{COX-2}/\text{COX-1}$ ratios of 2.3 for ibuprofen, 0.16 for diclofenac and 0.19 for meloxicam. In all case, diclofenac was approximately one order of magnitude more potent than meloxicam for inhibiting COX activities (6–7-fold on COX-1 and 8–10-fold on COX-2). The overall COX selectivity of NSAIDs was unchanged when considering the IC_{80} s

ratios, although diclofenac appeared slightly more selective for COX-2 than meloxicam in this case (Table 1).

Ex vivo study

Tolerability of the medications

The 24 volunteers completed the study in accordance with the study protocol. Neither serious nor minor adverse events were observed or reported. Liver function tests, serum creatinine and C-reactive protein levels ($<5 \text{ mg l}^{-1}$), haematocrit, platelet and blood cell counts did not vary significantly over study duration.

Plasma concentration of NSAIDs

Measurement of plasma drug concentrations after a single and a repeated intake are shown in Table 2. Drug monitoring confirmed the good compliance of the patients

(only four abnormally low NSAIDs concentrations over 144 assays) and the lack of any occult intake of NSAID over study duration. Plasma drug concentrations were similar after a single and a repeated oral intake for both ibuprofen and diclofenac while a 1.8-fold increase in plasma concentration was noted for meloxicam at steady state ($P < 0.05$).

Inhibition of COXs activity

The relative changes of prostanoid formation after NSAID intake are shown in Table 3. Ibuprofen inhibited almost completely COX-1 activity after a single and a repeated intake whereas COX-2 inhibition averaged 80% at corresponding times. Diclofenac reduced COX-1 activity by about 70% and COX-2 by about 96% whatever treatment duration. In contrast, a significant increase ($P < 0.05$) in COX inhibition was observed after a repeated intake of meloxicam, which was more marked on COX-1

Table 1 *In vitro* potencies of diclofenac, ibuprofen and meloxicam to inhibit the synthesis of prostanoid by human whole blood COX isoenzymes. Data are expressed as concentration inhibiting COX activity by 50% [IC_{50}] or 80% [IC_{80}].

NSAID	COX-1		COX-2		Ratios		COX-1		COX-2		Ratios	
	IC_{50}^a	IC_{80}^a	IC_{50}^a	IC_{80}^a	COX-2/COX-1 ^a		IC_{50}^b	IC_{80}^b	IC_{50}^b	IC_{80}^b	COX-2/COX-1 ^b	
	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	IC_{50}	IC_{80}	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)	IC_{50}	IC_{80}
Diclofenac	0.35 ± 0.26	1.32 ± 0.10	0.06 ± 0.05	1.33 ± 1.34	0.17	0.10	0.25	1.17	0.04	0.16	0.16	0.13
Ibuprofen	6.05 ± 4.82	27.0 ± 15.90	19.90 ± 24.01	221.0 ± 710.0	3.29	8.19	4.30	40.80	10.00	74.90	2.33	1.84
Meloxicam	2.64 ± 2.49	8.92 ± 8.68	0.60 ± 0.82	2.51 ± 2.04	0.23	0.28	1.60	12.30	0.31	4.16	0.19	0.34

^aData obtained by the arithmetic mean \pm s.d. of individual IC_{50} or IC_{80} values. ^bData obtained from the mean concentration response curves.

Table 2 Monitoring of plasma NSAIDs concentrations after oral intake of 75 mg day⁻¹ of diclofenac SR, 400 mg three times daily of ibuprofen and 7.5 mg day⁻¹ of meloxicam. H.p.l.c. analysis was done as described in the method section. Concentration was determined 3.5 h after diclofenac, 2.5 h after ibuprofen and 5.5 h after meloxicam intake and steady-state was evaluated after 3 days of diclofenac, 2 days of ibuprofen and 5 days of meloxicam. Data are expressed as mean \pm s.d. of 24 volunteers.

Diclofenac ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ([μM])		Ibuprofen ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ([μM])		Meloxicam ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ([μM])	
Single	Repeated	Single	Repeated	Single	Repeated
0.38 ± 0.35	0.27 ± 0.18	24.0 ± 8.0	14.8 ± 5.9	0.62 ± 0.13	$1.09 \pm 0.37^*$
1.19 ± 1.10	0.85 ± 0.57	116.2 ± 38.7	70.4 ± 1.28	1.76 ± 0.37	$3.11 \pm 1.06^*$

* $P < 0.05$ vs single intake.

Table 3 *Ex vivo* inhibition of prostanoid formation in whole blood after single and repeated oral intake of diclofenac, ibuprofen or meloxicam. Results are expressed as percentage of inhibition of TXB₂ production, as a reflect of platelet COX-1, and PGE₂ production, as a reflect of monocyte COX-2, relative to the predose values.

NSAID (dose)	COX-1 inhibition (%)		COX-2 inhibition (%)	
	Single	Repeated	Single	Repeated
Diclofenac (75 mg day ⁻¹)	69 ± 22	71 ± 18	95 ± 16	97 ± 5
Ibuprofen (400 mg three times daily)	96 ± 3	90 ± 16	83 ± 12	76 ± 20
Meloxicam (7.5 mg day ⁻¹)	30 ± 16	$55 \pm 20^*$	63 ± 16	$83 \pm 13^*$

All values are mean \pm s.d.; * $P < 0.05$ vs single.

(1.8-fold change) than on COX-2 (1.3-fold change). It is worth noting that four subjects in the meloxicam phase of the study failed to show any detectable inhibition of prostanoid synthesis, despite drug plasma levels in the therapeutic range. This explains, as least in part, the higher scattering of values observed with meloxicam than with other NSAIDs, especially for COX-1 inhibition.

In vivo relevance of in vitro data

Transformation of whole blood into plasma drug concentration
 Haematocrit averaged $0.44 \pm 0.02 \text{ l l}^{-1}$ throughout study duration and the corresponding dividing factor was 1.81 ± 0.07 for the transformation of whole blood into plasma concentrations. The comparison between the expected whole blood concentration of NSAIDs and the concentration really measured by h.p.l.c. in plasma showed that the correcting factor averaged 1.65 ± 0.24 for ibuprofen, 1.34 ± 0.20 for diclofenac and 1.49 ± 0.13 for meloxicam. Thus, the transformation of whole blood into plasma concentrations differed slightly between NSAIDs and was not fitted adequately when considering haematocrit only. These data suggested that NSAIDs entered, at least in part, into whole blood cells.

Overall predicting value of the in vitro assay

The mean dose-response curves reconstructed by considering the plasma concentration of NSAIDs measured

in vitro are depicted in Figure 1(a,b,c). When considering the plasma concentrations measured after single and repeated drug intake, the expected (theoretical) levels of COX inhibition were quite similar if they were calculated from the individual or the mean concentration-response curves (data not shown). However, when these theoretical levels were matched to those measured after NSAID intake, a larger than expected scattering of experimental

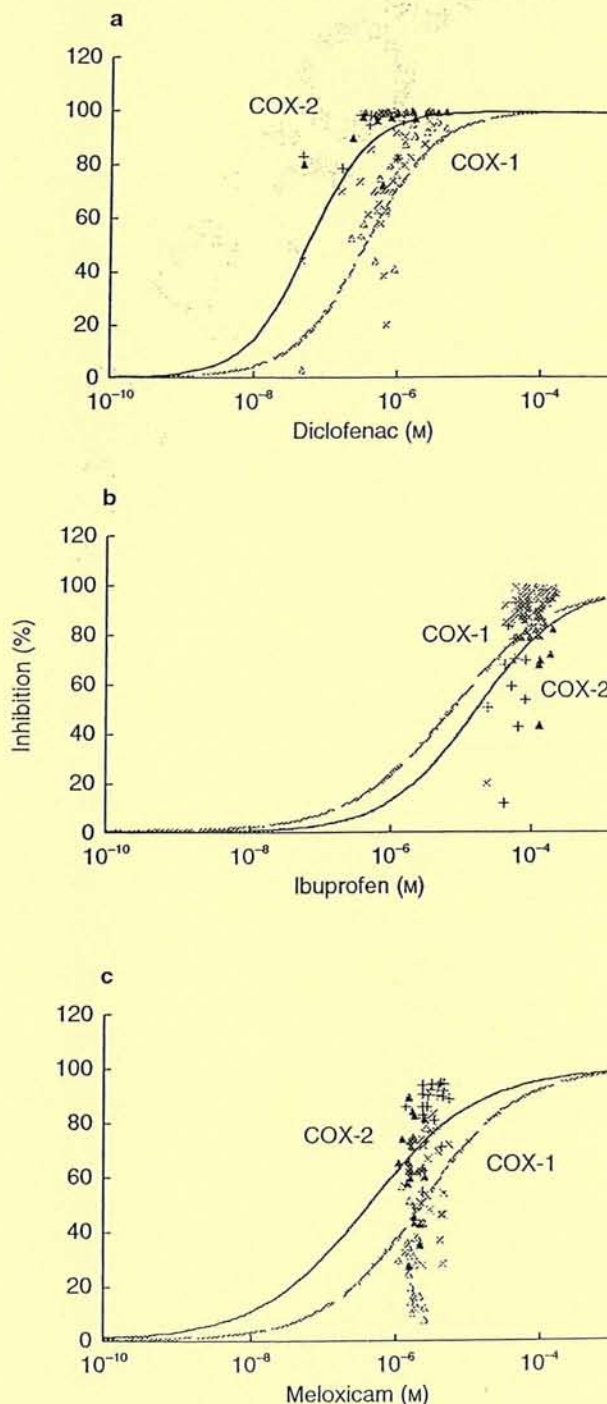


Figure 1 Comparison of NSAID concentrations and inhibition of COX activities in human blood assessed *in vitro* and *ex vivo*. The *in vitro* dose-response curves of platelet COX-1 (grey hatched line) and monocyte COX-2 (black line) activities were done for diclofenac (a), ibuprofen (b) and meloxicam (c). Increasing concentrations of NSAIDs were incubated with 1 ml whole blood samples allowed to clot for 1 h, and serum TXB₂ levels were measured as a reflection of thrombin-induced platelet thromboxane A₂ production. NSAIDs were also incubated with 1 ml heparinized whole blood samples in the presence of aspirin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) and LPS ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) for 24 h, and plasma PGE₂ levels were assayed as a reflection of endotoxin-induced monocyte COX-2 activity. *In vitro* whole blood concentrations of NSAIDs were corrected into plasma concentrations using a dividing factor of 1.34 for diclofenac, 1.65 for ibuprofen and 1.49 for meloxicam. Results, depicted as percentage inhibition, were obtained from triplicates of the 24 volunteers and concentration-response curves were fitted according to the Hill function as described in the method section. In the *ex vivo* study, plasma NSAIDs concentrations measured after single and repeated intake of diclofenac 100 mg once, ibuprofen 400 mg three times daily or meloxicam 7.5 mg once were plotted on the same graph as the percentage of inhibition of COX-1 (Δ: single; ×: repeated) and COX-2 (▲: single; +: repeated) activities measured *ex vivo* at the same time.

data was observed (Figure 1a,b,c). The *in vivo* inhibitory potency of diclofenac was predicted by the *in vitro* assay: $[-0.18, 0.21]$ for COX-1 and $[-0.13, -0.03]$ for COX-2. For ibuprofen, the *in vitro* assay was relevant for COX-1 $[-0.18, 0.03]$ but not for COX-2 $[-0.14, 0.27]$ whereas it was relevant for COX-2 $[-0.05, 0.15]$ but not for COX-1 $[0.31, 1.05]$ in the case of meloxicam. When existing, the predicting value of the *in vitro* assay was better for a repeated intake than for a single intake of diclofenac ($[-0.10, -0.02]$ vs $[-0.19, -0.01]$ for COX-2, respectively) or meloxicam ($[-0.15, -0.01]$ vs $[-0.01, 0.35]$ for COX-2, respectively), whereas the contrary was observed for ibuprofen ($[-0.24, 0.18]$ vs $[-0.13, -0.10]$ for COX-1, respectively) (Figure 1). These data were consistent both with the lowest scattering of plasma concentrations of diclofenac and ibuprofen at corresponding times and with the significant increase in circulating meloxicam between single and repeated intake (Table 2).

Influence of protein binding on the predicting value of the *in vitro* assay

The unbound fraction mirrored the total concentration of NSAIDs, since the concentrations of free diclofenac or ibuprofen were similar after single and repeated intake whereas this of free meloxicam increased with the repetition of the dose (data not shown). In the case of ibuprofen, the unbound fraction was identical *in vitro* ($0.27 \pm 0.07\%$) and *in vivo* ($0.23 \pm 0.07\%$ after a single intake, $0.22 \pm 0.08\%$ after a repeated intake), highlighting that circulating metabolites did not contribute to protein binding. When the predicting value of the *in vitro* assay was tested using the free concentration of NSAIDs, the data were similar to those obtained with the total concentration of drugs: (i) predictability was achieved in the $[-0.25, +0.25]$ interval except for meloxicam on COX-1 (Figure 2) and ibuprofen on COX-2 (Figure 3); (ii) predictability was at best after a repeated intake of diclofenac or meloxicam but a single intake of ibuprofen.

Influence of stereoselectivity on the predicting value of the *in vitro* assay

As the drug added *in vitro* to donated blood samples was ibuprofen racemate, the dose-response curves were easily refitted by considering *S*-(+)-enantiomer as half of the concentration applied (Figure 4). *In vivo*, the ratio of *S*-(+)/*R*-(-) ibuprofen enantiomers varied between individuals (range $[0.87-3.89]$) and increased from 1.45 ± 0.41 (mean \pm s.d.) after a single intake to 2.18 ± 1.03 after a repeated intake. When considering the plasma levels of the *S*-(+)-enantiomer only, the *in vitro* whole blood assay was predictive of the *in vivo* COX inhibition after a single intake of ibuprofen ($[-0.12, -0.10]$ for COX-1, $[-0.12, 0.07]$ for COX-2). After a repeated

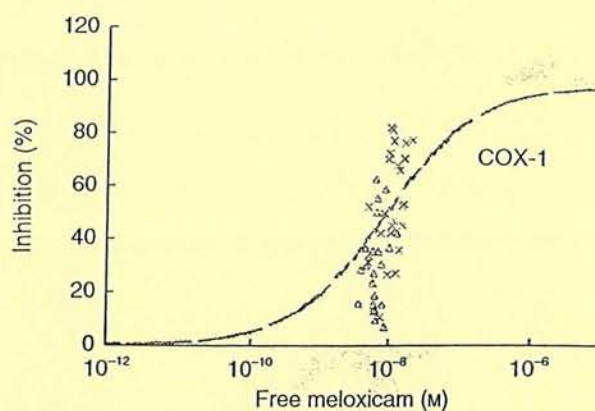


Figure 2 Discrepancy between inhibition of platelet COX-1 activity by free meloxicam *in vitro* and percentage of COX-1 inhibition observed *ex vivo* after an oral intake of 7.5 mg day^{-1} (Δ : single intake; \times : repeated intake).

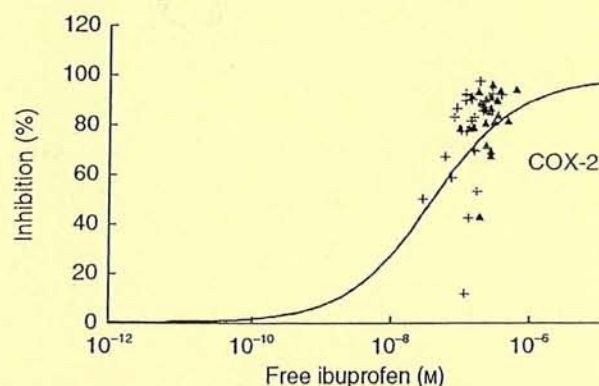


Figure 3 Discrepancy between inhibition of monocyte COX-2 activity by free ibuprofen racemate *in vitro* and percentage of COX-2 inhibition observed *ex vivo* after an oral intake of 400 mg three times daily (\blacktriangle : single intake; $+$: repeated intake).

drug intake, the inhibitory potency was estimated adequately on COX-1 ($[-0.22, 0.21]$) but not on COX-2 ($[-0.25, 0.68]$) (Figure 4). Similar data were obtained when considering the unbound fraction of the *S*-(+)-enantiomer (data not shown), demonstrating that this limitation was not supported by a variable stereoselective protein binding.

Discussion

The present work investigated if the COX inhibitory potency of NSAIDs determined with the *in vitro* whole blood assay was relevant for clinical practice. The rationale was that the whole blood system is unique for comparing *in vitro* and *in vivo* data in the same subject [10, 12, 14], and is often considered as a reference system for establishing the selectivity of NSAIDs towards COX isoenzymes [11, 13]. The clinical relevance of any *in vitro* assay is of

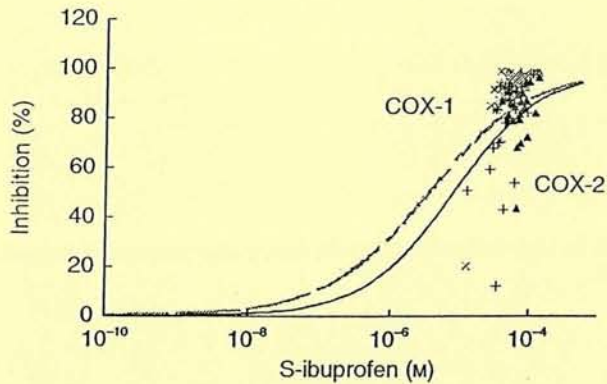


Figure 4 Influence of enantioselectivity on the inhibitory potency of ibuprofen towards COX activities in human blood assessed *in vitro* and *ex vivo*. The *in vitro* dose-response curves of platelet COX-1 (grey hatched line) and monocyte COX-2 (black line) activities were done considering that the *S*-(+)-enantiomer represented half of the racemate concentration. Results, depicted as percentage inhibition, were obtained from triplicates of the 24 volunteers and concentration-response curves were fitted according to the Hill function as described in the method section. In the *ex vivo* study, plasma concentrations of *S*-(+)-ibuprofen measured after a single and a repeated intake of 400 mg three times daily of ibuprofen racemate were plotted on the same graph vs the percentage of inhibition of COX-1 (Δ : single; \times : repeated) and COX-2 (\blacktriangle : single; $+$: repeated) activities measured *ex vivo* at the same time.

primary importance since efforts were made to evidence a link between the COX selectivity ratio of NSAIDs and their ability to produce severe gastro-intestinal complications [13, 24], a meaning supported further by the low incidence of clinically important upper gastrointestinal events with 'selective COX-2 inhibitors' [25, 26]. As all *in vitro* systems, the whole blood assay is limited by its relevance to the level of COX inhibition in target tissues, i.e. inflamed joints and gastric mucosa, but offers advantage of investigating biochemical selectivity *ex vivo* at therapeutic plasma levels of NSAIDs [14, 27].

In our experimental conditions, we pointed out that the level of COX-1 and COX-2 inhibition achieved *in vivo* can not be predicted universally from corresponding *in vitro* dose-response curves. Indeed, the predictability of the whole blood assay was suitable for diclofenac, acceptable for ibuprofen, although with some limitations relative to COX-2 inhibition, but unadapted to meloxicam. As we did not study range doses of each NSAID, we cannot rule out that the predictability of the system would be influenced by drug dosage, since a variable selectivity profile could have appeared at lower doses of NSAIDs. Consistent with this are both the quite complete inhibition of COX-1 by ibuprofen and COX-2 by diclofenac from the first drug intake and the well known dose-dependent inhibition of COX isoenzymes by NSAIDs [16, 27]. This quite unexpected finding was

favoured by our choice of sampling blood at a time consistent with a high plasma concentration of drugs, since COX inhibition follows the pharmacokinetics of NSAIDs [16, 28]. However, one must underline that clinical trials demonstrated an equivalent efficacy of daily doses of 7.5 mg of meloxicam and 100 mg of diclofenac in osteoarthritis [18], whereas the time for blood sampling was shown as critical for interpreting the inhibitory potency of meloxicam on platelet functions [16, 17, 27]. As the limitation of the *in vitro* whole blood assay was observed mainly with meloxicam, whose lower doses are ineffective [18], we think that our study protocol allowed a convenient though no exhaustive analysis of the clinical relevance of the system. Furthermore, the plasma concentration of drugs were 28–40-fold higher for diclofenac, 8–14-fold higher for meloxicam, and 12–19-fold higher for ibuprofen than their corresponding *in vitro* IC₅₀ on COX-2, confirming that the doses could be assumed to have at least an equal anti-inflammatory efficacy.

In an effort to explain the variable predictability of the whole blood system, we searched for possible causes related to the biological system itself. As our *in vitro* IC₅₀ COX-2/COX-1 ratios were close to those reported with the same methodology [12, 13, 27], such limitation is unlikely to result from our experimental conditions. However, the intrasubject variation reached 26% $\lambda \pm$ for COX-1 and 18% $\lambda \pm$ for COX-2, whereas the intersubject variation reached 39% for COX-1 and 36% for COX-2. These results are in good accordance with previous clinical studies [12, 16, 27, 28], but confirms that biological variability is a possible limitation of the whole blood assay [11] since scattering in baseline levels of prostanoids may exceed this of purified enzymes or cell-based assays [4, 5, 10]. Furthermore, this intersubject variation makes hazardous to study the inhibitory potency of NSAIDs in a small number of patients and to extrapolate the individual level of COX inhibition from the dose-response curve of foreign patients. As the number of patients used for establishing the dose-response curves of NSAIDs varied from 5 [10] to 20 [29], the comparison of published selectivity ratios could be disturbed by the variability of the system, even if we failed to improve its clinical relevance when considering individual instead of mean dose-response curves. Since each of our 24 subjects balanced the mean dose-response with the same weight, this finding was not unexpected although it highlighted that the predicting value of the whole blood system remained limited even when the intersubject variation was taken into account.

Estimation of the *in vivo* extent of COX inhibition from the plasma concentration of NSAIDs is based generally on the prerequisite that drugs do not enter red cells and that haematocrit is 45% [10, 12]. Unfortunately, we demonstrated that the drugs partitioned differently into whole

cells, although the difference remained moderate between molecules since they were acidic in nature. The factor accounting for the transformation of whole blood into plasma concentrations followed a different rank order from the drug pKa, suggesting that it was influenced by the lipophilicity of the molecules. Despite having a limited influence for interpreting data with classical NSAIDs, we suggest that it could be a major flaw to neglect the ability of non acidic molecules to enter red cells since, for example, celecoxib is thought to be evenly distributed between erythrocytes and plasma [30]. In addition, the use of a normalized haematocrit has no influence as long as the studies are made in healthy subjects of the same sex, but it adds further limitation to the predicting value of the whole blood system in patients with chronic inflammation.

From a pharmacokinetic point of view, inhibition of COX isoenzymes by NSAIDs may differ between *in vitro* and *in vivo* conditions because drugs can accumulate in the target cells, can be degraded variably between individuals or may act through metabolites [10, 12]. We demonstrated that diclofenac exhibited a higher COX-2 selectivity than meloxicam *in vitro* although it inhibited COX-1 more efficiently than meloxicam after single and repeated oral intake. As their metabolites are inactive [18, 20], such discrepancy cannot be explained by a slower metabolism of meloxicam than of diclofenac in liver. A more likely explanation is that, when drugs were administered at half the maximal recommended doses, the plasma concentration of diclofenac exceeded its inhibitory potency on COX isoenzymes more largely than this of meloxicam, as we discussed before. As meloxicam 7.5 mg day^{-1} was as effective as a higher dose of diclofenac in clinical studies [18], this finding challenges further the exclusive contribution of COX inhibition in the therapeutic effects of some NSAIDs. Besides, Panara and coworkers reported that the 35% inhibition of platelet COX-1 activity by 15 mg day^{-1} of meloxicam corresponded to a 70% inhibition of monocyte COX-2 activity at steady-state [27], which confirms that oral doses of meloxicam were not excessive in terms of COX inhibition. For ibuprofen, we investigated the contribution of the *S*-(+)-enantiomer because it is several order of magnitude more potent than the *R*-(-)-enantiomer in inhibiting prostaglandin synthesis *in vitro* [31] and can be generated *in vivo* by enantiomeric inversion via the formation of coenzyme A thioesters [32]. We showed that the *S*-(+)/*R*-(-) ratio was highly variable at a given time and increased with repetition of the dose in the same subject. Although this ratio is not an ideal index of fractional inversion, as it depends also on protein binding, one must underline that the predicting value of the *in vitro* assay on COX-2 was not changed when considering the *S*-(+)-enantiomer only. As the weakest predictability was observed at steady-state, that is when the *S*-(+)/*R*-(-) ratio was the highest,

it is tempting to speculate that the higher than expected inhibition of COX-2 could be supported by the additional contribution of the *R*-ibuprofenoyl-CoA thioester [33].

Protein binding is another key limiting factor of the pharmacokinetics of NSAIDs which is thought to be accurately reproduced by the *in vitro* whole blood assay [10, 12]. As NSAIDs are highly bound to albumin, we searched for intersubject variability in protein binding as a possible limitation of the system. We demonstrated that the inability of the whole blood assay to predict the inhibitory potency of meloxicam on COX-1 cannot be ascribed to an abnormal protein binding. This appears logical when considering that unbound fraction of NSAIDs is a faithful reflection of their total concentration in healthy volunteers, that protein binding of meloxicam is linear in its therapeutic range [18], and that any occult λ intake of NSAID was excluded by a careful plasma monitoring. For ibuprofen, the measurement of free drug concentration was of particular interest since protein binding can vary from linear to non linear depending on the dose and includes a stereoselective competition for albumin sites [19]. The concentration of free *S*-(+)-ibuprofen, the less protein bound enantiomer [32], varied differently from those of unbound racemate, with a higher proportion of the *S*-enantiomer after a repeated (81%) than after a single intake (72%). This finding agreed well with the concomitant increase in the *S*-(+)/*R*-(-) ratio suggesting that it was reflecting the chiral inversion rather than the enantiomeric protein binding. However, despite this relative increase in the unbound active fraction, the *in vitro* system still underestimated the inhibitory potency of ibuprofen on COX-2 at steady state. Thus, our data are consistent with the possible contribution of additional metabolites to the *in vivo* COX-2 inhibitory potency of ibuprofen.

The inability of the whole blood assay to estimate the inhibitory potency of meloxicam on COX-1 needs further discussion. It is noticeable that inhibition of COX-1 by meloxicam showed the highest scattering of values, with coefficients of variation averaging 53% after single and 36% after repeated drug intake. This variability was unexpected since it contrasted with the homogeneity of *ex vivo* COX-2 inhibition and plasma concentration of meloxicam. Surprisingly, the increase in plasma concentration of meloxicam with repetition of the dose paralleled its inhibitory potency on COX-1 (1.8-fold increase) but not on COX-2 (1.3-fold increase). A similar dissociation between circulating drug levels and COX inhibition was reported after a repeated intake of increasing doses of meloxicam, although both COX iso-enzymes were affected similarly [27]. Interestingly, a possible cumulative inhibition of COX-1 was suggested to explain the higher than expected inhibition of platelet activity [27]. In contrast, an adaptation of platelet COX-1 was proposed to

explain the lower inhibition of COX-1 by meloxicam at steady-state than it could be expected from its level of inhibition after a single dose [16]. Our results support none of these proposals since inhibition of COX-1 followed the plasma concentration of meloxicam between single and repeated intake. We suggest that the inability of the whole blood assay to estimate COX-1 inhibition by meloxicam was partly attributable to the lack of inhibition observed in some subjects despite drug plasma concentrations in the therapeutic range. Although it remains unexplained, this finding contributes likely to scattering of values in the most critical, i.e. the linear, part of the sigmoidal dose-response curve. The variable influence of plasma concentration of meloxicam on COX-1 and COX-2 activity may reflect a higher drug accumulation in monocytes than in platelets. Alternatively, a different mechanism of inhibition of COX iso-enzymes by meloxicam cannot be excluded [34], since we did not performed recovery experiments.

Conclusions

The present cross-over study revisited the clinical relevance of the whole blood assay through comparing the COX inhibitory potency of NSAIDs *in vitro* and *in vivo* in the same subjects. We confirmed that the biological variability of the system was high, although this does not exceed its advantages as long as a sufficient (high) number of subjects is considered. We showed further that the selectivity ratios obtained *in vitro* using IC_{50} s gave a somewhat misleading view of the selectivity of NSAIDs in clinical use, with diclofenac and meloxicam being more COX-2 selective *in vitro* than *in vivo*. In addition, the *in vitro* whole blood assay estimated adequately the *ex vivo* inhibition of COXs iso-enzymes by diclofenac but was not adapted to this of meloxicam on COX-1 and ibuprofen on COX-2, even when considering variability due to protein binding or chiral inversion. These data extend previous work with the whole blood assay [14, 16, 27] to underline the limitations of assessing COX-2 selectivity based on *in vitro* studies and pharmacological modelling, even with a 'more physiological' system. We conclude that there is a need to investigate COX selectivity at therapeutic plasma concentrations of NSAIDs, as assessed *ex vivo* with the same assays.

The authors will to thank Françoise Groussin for her excellent technical assistance and Pierre Gillet for his helpful comments on the manuscript.

This work was supported by grant n°971016 from the 'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé' of the French Minister for Health.

References

- 1 Vane JR. Inhibition of prostaglandins as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol* 1971; 231: 232-235.
- 2 Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van de Putte L, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12: 1063-1073.
- 3 Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97-120.
- 4 Meade EA, Smith WL, DeWitt DL. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1993; 268: 6610-6614.
- 5 Battistini B, Botting R, Bakhle YS. Cox-1 and Cox-2: Towards the development of more selective NSAIDs. *Drug News Perspectives* 1994; 7: 501-512.
- 6 Vane JR. Towards a better aspirin. *Nature* 1994; 367: 215-216.
- 7 Jouzeau J-Y, Terlain B, Abid A, Nédélec E, Netter P. Cyclooxygenase isoenzymes: how recent findings affect thinking about non steroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs* 1997; 53: 563-582.
- 8 Frölich JC. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18: 30-34.
- 9 Griswold DE, Adams JL. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev* 1996; 16: 181-206.
- 10 Pairet M. Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. Analysis of the *in vitro* test systems and their clinical relevance. *J Clin Rheumatol* 1998; 4: S17-S25.
- 11 Lipsky PE, Abramson SB, Crofford L, DuBois RN, Simon L, Van de Putte LBA. The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J Rheumatol* 1998; 25: 2298-2303.
- 12 Patrignani P, Panara MR, Sciulli MG, Santini G, Renda G, Patrono C. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 623-631.
- 13 Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7563-7568.
- 14 Panara MR, Padovano R, Sciulli MG, Santini G, Renda G, et al. Effects of nimesulide on constitutive and inducible prostanoic acid biosynthesis in man. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63: 672-681.
- 15 Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998; 104: 413-421.
- 16 Tegeder I, Lötsch J, Krebs S, Muth-Selbach U, Brune K, Geisslinger G. Comparison of inhibitory effects of meloxicam and diclofenac on human thromboxane biosynthesis after single doses and at steady state. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 533-544.
- 17 Stichtenoth DO, Wagner B, Frölich JC. Effects of meloxicam and indomethacin on cyclooxygenase pathways in healthy volunteers. *J Invest Med* 1997; 45: 44-49.
- 18 Degner F, Türck D, Pairet M. Meloxicam. Pharmacological, pharmacokinetic and clinical profile. *Drugs of Today* 1998; 34: (ASupplement,) 1-22.

- 19 Davies NM. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34: 101–154.
- 20 Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. *Clin Pharmacokinet* 1997; 33: 184–213.
- 21 Lopicque F, Netter P, Bannwarth B, Trechot P, Gillet P, *et al.* Identification and simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs using high performance liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Applic* 1989; 496: 301–320.
- 22 Presle N, Lopicque F, Gillet P, Hermann MA, Bannwarth B, Netter P. Effect of dimethicone (polysilane gel) on stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54: 351–354.
- 23 De Lean A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose–response curve. *Am J Physiol* 1978; 235: E97–E102.
- 24 Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 26: 2–10.
- 25 Bombardier C, Laine L, Reicin D, Shapiro D, Burgos-Vargas R, *et al.* Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1520–1528.
- 26 Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T *et al.* Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *JAMA* 2000; 284: 1247–1255.
- 27 Panara MR, Renda G, Sciulli MG, Santini G, Di Gamberardino M, *et al.* Dose-dependent inhibition of platelet cyclooxygenase-1 and monocyte cyclooxygenase-2 by meloxicam in healthy subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290: 276–280.
- 28 Patrono C, Ciabattoni G, Patrignani P, Pugliese F, Filabozzi P *et al.* Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition. *Circulation* 1985; 72: 1177–1184.
- 29 Cullen L, Kelly LO, Connor S, Fitzgerald DJ. Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 578–582.
- 30 Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38: 225–242.
- 31 Boneberg EM, Zou M-H, Ullrich V. Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by R(–) and S(+)-ibuprofen. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 16S–9S.
- 32 Evans AM. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the profens: enantioselectivity, clinical implications, and special reference to S(+)-ibuprofen. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 7S–15S.
- 33 Neupert W, Brugger R, Euchenhofer C, Brune K, Geisslinger G. Effects of ibuprofen enantiomers and its coenzyme A thioesters on human prostaglandin endoperoxide synthases. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 487–492.
- 34 Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K, Isakson PC. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem J* 1999; 339: 607–614.

Authors Queries

Journal: BJCP
Paper: 1533

Dear Author

During the preparation of your manuscript for publication, the questions listed below have arisen. Please attend to these matters and return this form with your proof. Many thanks for your assistance

Query Reference	Query	Remarks
-----------------	-------	---------

REVISED MANUSCRIPT #01-1170-FL Arthritis and Rheumatism (sous presse)

**THE IN SITU UPREGULATION OF CHONDROCYTE INTERLEUKIN-1
CONVERTING ENZYME (ICE) AND IL-18 LEVELS IN EXPERIMENTAL
OSTEOARTHRITIS IS MEDIATED BY NITRIC OXIDE**

Christelle Boileau, Johanne Martel-Pelletier, Florina Moldovan, Jean-Yves Jouzeau*,
Patrick Netter*, Pamela T. Manning†, Jean-Pierre Pelletier

Osteoarthritis Research Unit, Hôpital Notre-Dame, Centre hospitalier de l'Université de
Montréal Montréal, Québec, Canada

*Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires-UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine,
Université Henri Poincaré, Vandoeuvre-Lès Nancy, France

†Pharmacia Corporation, St. Louis, MO

C. Boileau, MSc
J. Martel-Pelletier, PhD
F. Moldovan, MD, PhD
J-Y. Jouzeau, PharmD, PhD*
P. Netter, MD, PhD*
P.T. Manning, PhD†
J-P. Pelletier, MD

This study was funded in part by Pharmacia Corporation USA, Le Fonds de la Recherche en
Santé du Québec and the Pôle Européen Universitaire (Nancy, France).

Address correspondence and reprint requests to: Jean-Pierre Pelletier, MD, Osteoarthritis
Research Unit, Hôpital Notre-Dame, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM),
1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1, telephone 514-890-8000 ext.
26658, fax 514-412-7582, email: dr@jppelletier.ca

Short running title: L-NIL inhibits ICE and IL-18 in vivo.

Key indexing terms: nitric oxide inhibitor, ICE, IL-18, chondrocyte

ABSTRACT

Objective. The aim of this study was to investigate in situ the relationship between two key mediators implicated in osteoarthritis (OA) cartilage: nitric oxide (NO) and IL-1 converting enzyme (ICE). IL-18 was also studied and served as reference to the effect of ICE.

Methods. An OA model was created by sectioning the anterior cruciate ligament (ACL) of the right stifle joint of dogs by a stab wound. Dogs were divided into three experimental groups: 1) unoperated dogs that received no treatment; 2) operated dogs (OA) that received no treatment and 3) OA dogs that received oral *N*-iminoethyl-L-lysine (L-NIL; a specific iNOS inhibitor) (10 mg/kg/bid) starting immediately after surgery. The OA dogs were killed at 12 weeks after surgery. Specimens of cartilage from femoral condyles and tibial plateaus were processed for immunohistochemistry for ICE, IL-18 and PI-9, a natural inhibitor of ICE, followed by morphometric analysis. Moreover, the OA specimens from femoral condyles of dogs that received no treatment were dissected and incubated with specific inhibitors of different signalling pathways likely involved in the OA process: SB 202190 (10 μ M; a p38 MAP kinase inhibitor), PD 98059 (100 μ M; a MEK 1/2 inhibitor), NS-398 (10 ng/ml; a specific cyclooxygenase-2 inhibitor), and L-NIL (50 μ M).

Results. Data showed that both ICE and IL-18 were present in situ in dog cartilage with a significant increase in the level of these two proteins in OA cartilage. In contrast, the level of PI-9 was found to be lower in OA than normal cartilage; however, the difference did not reach statistical significance. Oral treatment with L-NIL induced an increase in the level of PI-9 and a decrease in ICE and IL-18 levels than OA cartilage for both the femoral condyles ($p < 0.0001$) and tibial plateaus ($p < 0.01$ for ICE and $p < 0.0001$ for IL-18); values were similar to normal dogs. Interestingly, in vitro experiments demonstrated significant inhibition of the ICE levels by p38, MEK 1/2, and COX-2 inhibitors, but not by an iNOS inhibitor.

Conclusion. This study demonstrated that in situ in OA cartilage, the stimulation of chondrocytes by NO is responsible, at least in part, for the upregulation of ICE and IL-18 synthesis while decreasing the level of the ICE inhibitor PI-9. The ICE level is controlled by the activation of at least two MAPK pathways, p38 and MEK 1/2. Interestingly, it appears that ICE synthesis is not regulated by the endogenous production of NO. These data again highlight the

role played by iNOS in regulating the synthesis of major catabolic factors involved in OA cartilage degradation.

Osteoarthritic (OA) lesions are produced by an imbalance between the anabolic and catabolic processes (1,2). Nitric oxide (NO) is a pleiotropic mediator that was shown to be intimately involved in the OA catabolic process (3-5). Experiments performed using the anterior cruciate ligament (ACL) canine model of OA have demonstrated that a treatment with a specific inhibitor of the inducible NO synthase (iNOS), N-iminoethyl-L-lysine (L-NIL), can induce a significant reduction in the progression of structural changes of the disease (6). This was reflected by a decrease in the severity of macroscopic and histologic lesions and was associated with a reduction in matrix metalloproteinase (MMP) synthesis, as well as the production of interleukin-1 β (IL-1 β) and prostaglandin E₂ (PGE₂) (6). Moreover, further experiments also showed that L-NIL treatment could decrease in situ the level of OA chondrocyte apoptosis (7).

Osteoarthritic chondrocytes were shown to express iNOS and produce large amounts of NO, especially upon stimulation by proinflammatory cytokines (8-12). Moreover, peroxynitrite, a NO end product, was detected in significant amounts in the synovial fluid of OA patients (13). Experiments have demonstrated that NO could also upregulate proinflammatory cytokines (14) and MMP synthesis (15), as well as inhibiting proteoglycan and collagen synthesis (16,17).

Of all the proinflammatory cytokines that are believed to be involved in the pathophysiology of OA, IL-1 β is believed to be a key player at inducing cartilage catabolism (1,2,18). This cytokine has the ability to modify chondrocyte metabolism, thus affecting cartilage extracellular matrix homeostasis. IL-1 β can enhance the level of the major catabolic factors in this tissue: proteases, prostaglandin/COX-2, iNOS, etc (18).

IL-18 is a cytokine primarily identified as an interferon (IFN)- γ -inducing factor (IGIF), which possesses structural similarities with the IL-1 protein family (19). The gene expression of this cytokine was demonstrated in different cell types including macrophages, endothelial cells, epidermal cells, osteoblasts, and recently, synovial fibroblasts and chondrocytes (19,20). The level of IL-18 was found to be upregulated in OA tissues (21,22). The biological function of IL-18 was originally thought to be restricted to the induction of another inflammatory cytokine, INF- γ . However, recent work indicated a much broader role for IL-18, which was shown to induce inflammatory and catabolic responses similar to that of IL-1 β (19,23,24). Like IL-1 β , IL-18 is produced as a biologically inactive precursor that requires enzymatic processing in order to be released in the active form (25). In mammals, only one protease, ICE or caspase-1 can specifically generate the mature forms of these two proinflammatory cytokines (25,26).

ICE is a pro-enzyme polypeptide of 45 kDa (p45) located in the cellular membrane (26). This enzyme belongs to a family of cysteine aspartate-specific proteases named caspases. ICE is specific to IL-1 β and IL-18 and does not cleave the IL-1 α precursor (27). ICE is first produced as a precursor and requires two internal cleavages before being converted to an active enzyme of heterodimeric form, consisting of two subunits, p20 and p10 (28). The active site is located on the p20 chain. Interestingly, ICE contributes to the auto-processing of its own precursor (29). This enzyme processes pro-IL-1 β between residues Asp 116-Ala 117 to produce active, mature IL-1 β . It also cleaves pro-IL-1 β at a secondary site (Asp 27-Gly 28), which is then further processed to the active form (28,30). The IL-18 cleavage of the human propeptide, however, appears to occur only at the Asp 36-Tyr 37 site (31). A natural ICE inhibitor has recently been identified and belongs to the serpin protease inhibitor and is termed serpin PI-9 (32,33). The level of ICE has been demonstrated to be increased in OA tissues and was found to be responsible in situ for the increased production of active IL-1 β and IL-18 (21).

ICE is a crucial enzyme in the activation process of IL-1 β and IL-18, two important proinflammatory cytokines involved in OA progression. Moreover, in vivo, the specific inhibition of NO induces a downregulation of IL-1 β synthesis in OA tissues (14).

Based on these findings, the aim of the present study was to first further investigate the role of iNOS in vivo in the regulation of the IL-1 β system by exploring its effect on the ICE level and one of the main natural inhibitors of ICE in situ in cartilage. Moreover, the effects of iNOS in vivo on IL-18 was also studied and served as reference to the effect of ICE. Furthermore, using in vitro experiments, the mechanisms which can modulate the ICE level in OA cartilage were explored. The latter experiment was performed using the dog OA cartilage explants and employing a number of selective inhibitors of different intracellular pathways.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Groups

Specimen selection. Twenty-six adult crossbred dogs (2-3 years old), weighing 20-25 kg, were used for this study. Specimens of cartilage were obtained from dogs of different experimental groups included in our previous study (6) were used: Group 1 (n = 6), unoperated dogs; Group 2 (n = 6), operated (OA) untreated dogs; Group 3 (n = 5), OA dogs treated with L-NIL (10 mg/kg twice daily orally) beginning immediately after surgery. For the in vitro experiments (n = 8-9),

cartilage from OA dogs that received no treatment were used for explant culture experiments. Osteoarthritis was surgically induced by sectioning the anterior cruciate ligament of the right knee through a stab wound incision as previously described (6).

Cartilage Sampling and Explant Culture

Immediately after the dogs were sacrificed, and their right knees were dissected aseptically as previously described (6), cartilage samples were obtained by dissecting full-thickness strips of cartilage across the lesioned areas of articular cartilage from femoral condyles and tibial plateaus and processed for immunohistochemistry. The cartilage specimens from the medial and lateral femoral condyles and tibial plateaus were processed separately.

Femoral condyles were obtained as described above and processed for explant culture (34). After dissection, the explants (approximately 150 mg) were rinsed in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco-BRL Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) and incubated for 48 hours at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air in DMEM containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), and antibiotics (100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) in the presence or absence of the following inhibitors: SB 202190 (10 µM; inhibitor of p38; Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA); PD 98059 (100 µM; inhibitor of MEK1/2; Calbiochem-Novabiochem); NS-398 (10 ng/ml; specific inhibitor of COX-2; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI); N-iminoethyl-L-lysine (L-NIL) (50 µM; inhibitor of iNOS; Monsanto, St Louis, MO). The concentrations of the different inhibitors that were used in the present experiments were found in a previous study (34) to be optimal under similar experimental conditions.

Immunohistochemistry

Cartilage specimens were processed for immunohistochemistry as previously described (21). Briefly, specimens were fixed in TissuFix #2 (Laboratoires Gilles Chaput, Montréal, Québec, Canada) for 24 hours then embedded in paraffin. Sections (5 µm) of paraffin-embedded specimens were placed on Superfrost Plus slides (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada), deparaffined in toluene, dehydrated in a graded series of ethanol, rinsed in water and in phosphate saline buffer (PBS), pH 7.4 and preincubated in chondroitinase ABC (0.25 units/ml in PBS pH 8.0; Sigma) for 60 minutes at 37°C (when using IL-18 antibody) or heated at 65°C for 20 minutes in 10 mM citrate buffer, pH 6.0 (when using ICE and PI-9 antibodies). Slides were then washed three times in PBS, pH 7.4, followed by a 30-minute incubation in 0.3% Triton-X 100 (Sigma, St. Louis, MI) in PBS and a 30-minute incubation in 2% hydrogen peroxide in methanol. They were further incubated with 5% milk in Universal Blocking Solution (Dako

Diagnostics Mississauga, Ontario, Canada) for 30 minutes and overlaid with antibodies for 18 hours at 4°C in a humidified chamber.

The antibody used for ICE was an affinity-purified rabbit polyclonal antibody raised against a peptide corresponding to amino acids 2-20 mapping the amino terminus of the ICE precursor of human origin and termed A-19 (SC-622, 10 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). This antibody recognizes the precursor form of ICE. The antibody used for IL-18 was an affinity-purified rabbit polyclonal antibody raised against a peptide corresponding to amino acids 21-193 of IL-18 of human origin and termed H-173 (SC-7954, 10 µg/ml; Santa Cruz Biotechnology). This antibody recognized both pro and active forms of IL-18 and did not cross-react with IL-1α or IL-1β. The antibody used for PI-9 was a gift from Dr. Walter Kisiel (School of Medicine, University of New Mexico, Albuquerque, NW) (32). This antibody was a rabbit anti-human PI-9 IgG and was used at a concentration of 10 µg/ml.

Slides were washed three times in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 and stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlington, ON). The colour was developed with 3-3'-diaminobenzidine (DAB substrate chromogen, Dako Diagnostics) containing hydrogen peroxide, and the slides were counterstained with eosin.

To determine the specificity of staining, 3 controls were used: 1) adsorbed immune serum for 1 hour at 37°C with a ten-fold molar excess of rHuICE (gift from Dr. Danley, Pfizer, Groton, CT) and rHuIL-18 (R&D Systems, Minneapolis, MN); 2) omission of the primary antibody; 3) substitution of the primary antibody with non-immune IgG (Nordic Immunology, Tilburg, The Netherlands) following the same experimental protocol. Each slide was examined under a light microscope (Leitz Orthoplan; Wild Leitz, Ville Saint-Laurent, Quebec, Canada).

Morphometric Analysis

The presence of the antigen was estimated by determining the number of specific chondrocytes staining positive within the different layers of cartilage as described (21). The number of chondrocytes staining positive in the entire cartilage thickness, superficial zone (superficial and upper intermediate layers) and in the deep zone (lower intermediate and deep layers) was estimated as previously described (21). Briefly, each zone was divided into three different sections. The cell count scores were determined separately for the medial and lateral sides of the condyles and plateaus. The total number of chondrocytes and the number of chondrocytes staining positive for the specific antigen were determined using (21) using a Leitz Diaplan

microscope with the magnification X40. Each section was scored separately. These data from each section were then integrated as a mean for each specimen. The final results were expressed as the percentage of positive chondrocytes. The maximum score for each cartilage specimen was 100%. Each slide was subjected to double-blind evaluation, which resulted in a variation of <5%. The data obtained from each medial and lateral condyles and tibial plateaus were considered independent for the purpose of statistical analysis. For each arthritic specimen, it was ensured prior to evaluation that an intact cartilage surface could be detected and used as a marker for validation of morphometric analysis. Cartilage specimens were divided into two zones in order to examine if the effects of L-NIL occurred in the different cartilage layers. Data from each femoral condyle and tibial plateau were considered separately.

Statistical Analysis

Data were expressed as the mean \pm SEM and statistical analysis performed using the Mann-Whitney U test. P values <0.05 were considered significant.

RESULTS

ICE Level in Cartilage

The cartilage specimens from the femoral condyles and tibial plateaus of normal dogs were macroscopically and histologically normal as previously described (6). According to the experimental model, and as previously reported (6), untreated OA dogs had moderately severe lesions on both femoral condyles (data not shown) and tibial plateaus (Figure 1A) with more pronounced lesions on the plateaus. L-NIL treated dogs presented a marked reduction in severity of lesions (Figure 1A) (7).

We first determined the ICE level (precursor form) and its distribution in normal and OA articular cartilage. Data revealed that in normal cartilage from either femoral condyles (data not shown) or tibial plateaus (Figure 1A), only a few chondrocytes showed specific ICE staining. In contrast, in OA cartilage, a strong immunoreactivity of chondrocytes was observed through the entire thickness of the cartilage (Figure 1A). L-NIL-treated OA dogs revealed a similar pattern as the one found in normal cartilage. Controls including OA cartilage specimens, treated either with immunoadsorbed serum, rHuICE (data not shown) or pre-immune IgG, showed only background staining (Figure 1A).

The percentage of positively stained cells for the entire cartilage thickness (superficial and deep zones) was significantly higher in OA cartilage for both condyles and plateaus (Figures 1B, 1C) than normal. Comparison between superficial and deep zones showed a similar percentage of positive chondrocytes for the normal femoral condyles and tibial plateaus (Figures 1B, 1C). Each zone in OA cartilage demonstrated a statistically significant higher level of ICE than the autologous zone of normal cartilage (Figures 1B, 1C). A higher ICE level was found in the OA superficial compared to the deep zone. This difference between the OA cartilage zones did not, however, reach statistical significance for either condyles or plateaus. In the L-NIL treated OA dogs, the ICE level for the entire thickness of cartilage was similar to the level found in the normal femoral condyles but was slightly higher than those found on the tibial plateaus. These levels were statistically lower than the one found in the OA dogs (condyles, $p < 0.0001$; plateaus, $p < 0.01$). In those specimens, there was slightly lower ICE level in the deep zone than in the superficial zone. In both condyles and plateaus, a significant decrease in the ICE cell score in the superficial zone was found when OA L-NIL-treated cartilage was compared with those from untreated OA specimens (Figures 1B, 1C).

IL-18 Level in Cartilage

Immunohistochemical study also revealed that IL-18 was produced by dog chondrocytes, and its topographic distribution was very similar to ICE (Figures 2A-C). In normal, only a few chondrocytes produced IL-18 with a slightly higher level found at the superficial zone than at the deep zone (Figures 2B, 2C). In OA untreated dogs, a significant increase in IL-18 total cell score was noted when compared to normal. In the L-NIL treated group, the IL-18 total cell score was comparable to normal values. As for ICE, OA untreated specimens at both superficial and deep zones had statistically significant higher IL-18 levels than normal specimens (Figures 2B, 2C). L-NIL completely reversed this increase; values were similar to normal dogs.

PI-9 Level in Cartilage

Because the control of ICE function can occur at two levels, regulation of protease activation and/or regulation of the protease activity, we explored if the level of the natural and specific ICE inhibitor, PI-9, was also modulated in vivo by L-NIL treatment. Data showed that PI-9 was found mainly in the superficial zone of normal and OA cartilage. As shown in Figure 3, the PI-9 level in OA cartilage was slightly lower than in normal cartilage; however, the difference did not reach statistical significance. Interestingly, the L-NIL-treated group showed higher PI-9 levels

than seen in the OA group, and the values in this group were similar or slightly higher than the ones found in normal dogs.

Mechanisms Regulating ICE Production

To get a deeper insight into the regulating mechanisms and pathways involved in ICE production in OA cartilage, we investigated in vitro the effect of inhibitors of the different major intracellular signalling pathways. To this end, dog OA cartilage explants were incubated with or without SB 202190 (10 μ M), PD 98059 (100 μ M), NS-398 (10 ng/ml), and L-NIL (50 μ M), and the ICE level was evaluated by immunohistochemistry. The data showed (Figures 4A, 4B) that the inhibition of p38, MEK 1/2, COX-2, but not iNOS, significantly blocked ICE production.

DISCUSSION

Nitric oxide and its by products clearly participate in the promotion of OA cartilage catabolism through proinflammatory mechanisms (1,2,9,10,18). OA cartilage produces a large amount of NO, which is related to the regulation of iNOS levels in this tissue (35). This finding has provided the impetus for novel therapeutic approaches toward developing a new class of drugs directed against iNOS, which has led to the development of specific iNOS inhibitors, including L-NIL. This selective iNOS inhibitor was demonstrated, in the same experimental OA model, to exert positive effects on the progression of OA structural lesions (6,7). Collectively, these data in animal models have brought forward the therapeutic potential of iNOS inhibitors to be disease-modifying osteoarthritic drugs (DMOAD).

The main objective in the management of OA, in addition to reducing symptoms and minimizing functional disability, should be to reduce the progression of the articular structural changes. In this context, evidence supports the notion that the excessive production of proinflammatory cytokines, and in particular IL-1 β , plays a key role in the structural alterations of OA tissues (1,2). The control of this cytokine activity can be modulated at different levels. There has been recent enthusiasm for and evidence to support the use of agents or drugs which block the activity of the enzyme involved in the activation (maturation) of IL-1 β , ICE, in the treatment of arthritic diseases, including OA. Given the importance of ICE in the production of active IL-1 β , and the fact that iNOS inhibitors were found, both in vitro and in vivo (36), to inhibit IL-1 β production in OA tissue, we further explored the role of iNOS/NO on the different pathways regulating ICE production in OA cartilage.

In this study, we first demonstrated that ICE was present in dog cartilage and that its level was markedly increased in situ in OA. This finding is in accordance with our previous data, which show the presence of an increase level and activity of ICE in human OA cartilage (21). We also demonstrated that in vivo, a selective inhibitor of iNOS, L-NIL, could abrogate ICE production in OA cartilage. This reduction occurs throughout the entire cartilage thickness of the femoral condyle and to a lesser extent in the tibial plateau. This more pronounced effect on the condyle than in the plateau is not unique to the ICE enzyme but was also found to occur in other processes, including the in vivo effect of L-NIL on chondrocyte apoptosis (7). Although the exact reason remains to be determined, it is possible that these differences were related to the concentration of the inhibitor within the matrix. An alternative but not exclusive explanation might be that the lesions at the plateaus are generally more severe and may be less responsive to treatment.

Our data also confirmed that the IL-18 production, the other specific substrate of ICE (in addition to IL-1 β), was coordinately regulated with the production of the enzyme and showed a marked and simultaneous reduction of the levels of both proteins in the dogs treated with L-NIL. This correlation adds support to the notion that the increased level of ICE, which is present in OA cartilage, is actively participating in OA cartilage degradation through the activation of key catabolic cytokines such as IL-1 β and IL-18. The downregulation of ICE by treatment with L-NIL provides new additional information about the mechanisms by which the inhibitor could exert its protective effects against the progression of OA.

The demonstration that in vitro in cartilage explants, L-NIL failed to reduce the ICE level at a concentration that was sufficient to reduce NO production (34) indicates that the synthesis of ICE was not regulated by the endogenous production of NO. It is, therefore, possible that the downregulation of ICE in vivo in chondrocytes by L-NIL was due in addition to iNOS to the reduction in the exogenous stimulation of NO or other mechanisms involved in the regulation of ICE production.

This later hypothesis is most interesting as a number of inflammatory factors, such as IL-1 β , may upregulate the expression of ICE (37). Therefore, since the IL-1 β level is greatly increased in OA tissues, this could provide a logical explanation for the increased level of ICE in OA cartilage. Moreover, since L-NIL treatment has been previously demonstrated to reduce in vivo the level of IL-1 β in OA tissues in an experimental animal (14), this finding likely provides a

possible explanation for the decreased ICE level in this OA model. The likelihood that IL-1 β was, in fact, an important upregulating factor of ICE in experimental OA is further supported by the *in vitro* experiments showing that two MAPKs, p38 and MEK 1/2, are important factors in the upregulation of ICE *in situ* in OA cartilage (Figure 5). IL-1 β has, in fact, been shown to be a potent activator of these two MAPKs (38). Complementary to our findings is the recent report demonstrating that NO could interact with a number of intracellular pathways including the two MAP kinases which provides additional support to our findings on the role of NO in the upregulation of ICE.

The potential role for COX-2 and prostaglandins in the regulation of ICE level in OA is a novel and most interesting finding. This obviously needs further exploration but is bringing into perspective the possibility of cross-talk between the COX-2 and the ICE /IL-1 β system. The downregulation of COX-2/PGE₂ by L-NIL treatment brings forward another mechanism by which it could exert its effect on ICE.

Another important factor regulating the ICE activity is the presence of a physiological inhibitor. A natural inhibitor of ICE belonging to the serpin protease inhibitor family has been identified and is named PI-9 (32,33). Serine protease inhibitors, or serpins, are a family of 40-50 kDa proteins that are primarily involved in the regulation of physiological processes activated by proteases, such as prohormone activation and homeostasis. Serpins bind at the active site of their cognate proteases to form an inhibitory complex with 1:1 stoichiometry. In this study, we have demonstrated that the PI-9 level in OA cartilage was lower than that found in normal cartilage. This could very well be an additional factor which could favour an increase in the ICE activity in OA cartilage, since the increased level of ICE with a decrease in the level of its natural inhibitor will create an imbalance towards an increase in this enzyme activity. Interestingly, *in vivo*, L-NIL abrogated this imbalance as L-NIL reversed ICE and PI-9 levels to values similar as the normal. Therefore, the effect of iNOS inhibitor not only at reducing the level of ICE in OA cartilage but also at increasing the level of PI-9 provides two important mechanisms by which this inhibitor could exert protective effects on OA tissues.

In summary, this study demonstrated that in OA cartilage NO favours an increase in ICE activity by increasing the level of this enzyme at the same time as it decreases the level of a natural inhibitor, PI-9. Moreover, the concomitant increase in the level and activity of ICE in association with the increase in the level of IL-1 β could also contribute to the catabolism of OA

cartilage. The protective effects of iNOS inhibitors, *in vivo*, on the structural changes of OA could possibly be explained by this effect not only at reducing the synthesis of NO, but also at inducing a decrease in ICE activity and IL-18 synthesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Viorica Lascau-Coman for her expertise in processing the immunohistochemistry specimens, François Mineau for his assistance with the preparation of the figures, and Santa Fiori and Heather Yampolsky for their secretarial and editorial support.

REFERENCES

1. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis & Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. 14th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 2000. p. 2195-245.
2. Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Lajeunesse D. Biochemical factors in joint articular tissue degradation in osteoarthritis. In: Reginster JY, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Henrotin Y, editors. *Osteoarthritis: Clinical and Experimental Aspects*. Berlin: Springer-Verlag; 1999. p. 156-87.
3. Amin AR, Dave M, Attur M, Abramson SB. COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Curr Rheumatol Rep* 2000;2:447-53.
4. Clancy R, Rediske J, Koehne C, Stoyanovsky D, Amin A, Attur M, et al. Activation of stress-activated protein kinase in osteoarthritic cartilage: evidence for nitric oxide dependence. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:294-9.
5. Nishida K, Doi T, Matsuo M, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, Yoshida A, et al. Involvement of nitric oxide in chondrocyte cell death in chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:232-7.
6. Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR, Currie MG, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 1998;41:1275-86.
7. Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis *in vivo*: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* 2000;43:1290-9.
8. Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:263-8.
9. Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins PD, Evans CH. Nitric oxide in

- osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:377-9.
10. Lotz M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 1999;25:269-82.
 11. Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur MG, Tzeng E, Billiar TR, et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for an inducible "neuronal-like" nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995;182:2097-102.
 12. Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1Ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 1996;4:77-84.
 13. Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1219-22.
 14. Pelletier JP, Lascau-Coman V, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Currie MG, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol* 1999;26:2002-14.
 15. Murrell GAC, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:15-21.
 16. Järvinen TAH, Moilanen T, Järvinen TLN, Moilanen E. Nitric oxide mediates interleukin-1 induced inhibition of glycosaminoglycan synthesis in rat articular cartilage. *Mediators Inflamm* 1995;4:107-11.
 17. Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu HI, Evans CH. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:142-8.
 18. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*

2001;44:1237-47.

19. McInnes IB, Gracie JA, Liew FY. Interleukin-18: a novel cytokine in inflammatory rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 2001;44:1481-3.
20. Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Muhl H, et al. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol* 1998;63:658-64.
21. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Interleukin-1 β -converting enzyme/Caspase-1 in human osteoarthritic tissues: Localization and role in the maturation of IL-1 β and IL-18. *Arthritis Rheum* 1999;42:1577-87.
22. Olee T, Hashimoto S, Quach J, Lotz M. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol* 1999;162:1096-100.
23. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999;104:1393-401.
24. Wei XQ, Leung BP, Arthur HM, McInnes IB, Liew FY. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in mice lacking IL-18. *J Immunol* 2001;166:517-21.
25. Akita K, Ohtsuki T, Nukada Y, Tanimoto T, Namba M, Okura T, et al. Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. *J Biol Chem* 1997;272:26595-603.
26. Miller DK, Ayala JM, Egger LA, Raju SM, Yamin TT, Ding GJ, et al. Purification and characterization of active human interleukin-1 beta- converting enzyme from THP.1 monocytic cells. *J Biol Chem* 1993;268:18062-9.
27. Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* 1999;19:1-11.
28. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 1994;370:270-5.

29. Ramage P, Cheneval D, Chvei M, Graff P, Hemmig R, Heng R, et al. Expression, refolding, and autocatalytic proteolytic processing of the interleukin-1 β -converting enzyme precursor. *J Biol Chem* 1995;270:9378-83.
30. Dinarello CA. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann NY Acad Sci* 1998;856:1-11.
31. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, et al. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 1997;386:619-23.
32. Annand RR, Dahlen JR, Sprecher CA, De Dreu P, Foster DC, Mankovich JA, et al. Caspase-1 (interleukin-1beta-converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9. *Biochem J* 1999;342 Pt 3:655-65.
33. Young JL, Sukhova GK, Foster D, Kisiel W, Libby P, Schonbeck U. The serpin proteinase inhibitor 9 is an endogenous inhibitor of interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in human vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* 2000;191:1535-44.
34. Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J. Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of COX-2 and iNOS. *J. Rheumatol* 2001;28:2509-19.
35. Rediske J, Koehne CF, Zhang B, Lotz M. The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis Cart* 1994;2:199-206.
36. Presle N, Cipolletta C, Jouzeau JY, Abid A, Netter P, Terlain B. Cartilage protection by nitric oxide synthase inhibitors after intraarticular injection of interleukin-1beta in rats. *Arthritis Rheum* 1999;42:2094-102.
37. Moldovan F, Pelletier JP, Jolicoeur FC, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Diacerhein and rhein reduce the ICE-induced IL-1beta and IL-18 activation in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:186-96.
38. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1

induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 2000;43:801-11.

LEGEND

Figure 1: ICE (precursor form) level in normal, untreated osteoarthritic (OA) and L-NIL-treated OA dogs. A) Representative sections of tibial plateau showing ICE immunostaining in normal, OA and L-NIL-treated OA dogs (10 mg/kg/bid). No specific staining was seen with either immunoadsorbed or nonspecific IgG. **B, C)** Histograms of cell score for ICE level in the entire thickness of cartilage (total score) and in the superficial and deep zones in **(B)** femoral condyles and **(C)** tibial plateaus. The cell count scores were determined separately for each specimen from the medial and lateral condyles and plateaus. The data obtained were considered independent values for the purpose of statistical analysis. Bars show the mean and SEM scores. P values above OA and L-NIL indicate the difference with the normal, respectively, and where underlined, between OA and L-NIL-treated OA dogs.

Figure 2: IL-18 level in normal, untreated osteoarthritic (OA) and L-NIL-treated OA dogs. A) Representative sections tibial plateau showing IL-18 immunostaining in normal, OA and L-NIL-treated OA dog (10 mg/kg/bid). No specific staining was seen with either immunoadsorbed or nonspecific IgG. **B, C)** Histograms of cell score for IL-18 levels in the entire thickness of cartilage (total score) and in the superficial and deep zones in **(B)** femoral condyles and **(C)** tibial plateaus. The cell count scores were determined separately for each specimen from the medial and lateral condyles and plateaus. The data obtained were considered independent values for the purpose of statistical analysis. Bars show the mean and SEM scores. P values above OA and L-NIL-treated dogs indicate the difference with the normal, respectively, and where underlined, between OA and L-NIL-treated OA dogs.

Figure 3: PI-9 level in normal, untreated osteoarthritic (OA) and L-NIL-treated OA dogs. Histogram of cell score for PI-9 level in the femoral condyles (dark bars) and tibial plateaus (open bars) in the cartilage superficial zone. Bars show the

mean and SEM scores. The P value indicates statistical differences for the femoral condyles.

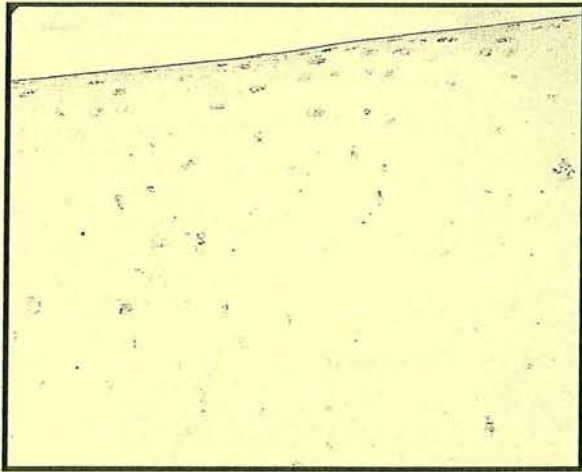
Figure 4: **In vitro regulation of ICE production in OA dogs cartilage.** A) Representative sections of femoral condyle showing ICE immunostaining in the absence or presence of specific inhibitors. B) Histogram of cell score for ICE level in the femoral condyle of the entire thickness of the cartilage of OA untreated in the absence or presence of specific inhibitors as indicated. Bars show the mean and SEM scores. P values indicate the difference between untreated and treated specimens.

Figure 5: **Flow chart describing the suggested mechanism of action by L-NIL on ICE production.** iNOS, inducible nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; p38 and MEK 1/2 are MAP kinase proteins; COX-2, cyclooxygenase-2; ICE, interleukin-1 β converting enzyme; IL-1 β , interleukin-1 β ; IL-18, interleukin-18. —| indicates inhibition.

- Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J.** Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *J Rheumatol.* 2001 Nov **28**:11 2509-19.
- Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau Coman V, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR, Currie MG, Martel-Pelletier J.** Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* 2000 Jun **43**:6 1290-9.
- Pelletier JP, Lajeunesse D, Jovanovic DV, Lascau Coman V, Jolicoeur FC, Hilal G, Fernandes JC, Martel-Pelletier J.** Carprofen simultaneously reduces progression of morphological changes in cartilage and subchondral bone in experimental dog osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000 Dec **27**:12 2893-902.
- Pelletier JP, Lascau Coman V, Jovanovic D, Fernandes JC, Manning P, Connor JR, Currie MG, Martel-Pelletier J.** Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. *J Rheumatol* 1999 Sep **26**:9 2002-14.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB.** Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 2001 Jun **44**:6 1237-47.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J.** In vivo protective effects of prophylactic treatment with tiaprofenic acid or intraarticular corticosteroids on osteoarthritic lesions in the experimental dog model. *J Rheumatol Suppl.* 1991 Feb **27** 127-30.
- Penglis PS, Cleland LG, Demasi M, Caughey GE, James MJ.** Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitors. *J Immunol* 2000 Aug 1 **165**:3 1605-11.
- Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Docter S, Graneto MJ, Lee LF, Malecha JW, Miyashiro JM, Rogers RS, Rogier DJ, Yu SS, Anderson GD, Burton EG, Cogburn JN, Gregory SA, Koboldt CM, Perkins WE, Seibert K, Veenhuizen AW, Zhang YY, Isakson PC.** Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzene nesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* 1997 Apr 25 **40**:9 1347-65.
- Pettipher ER, Henderson B, Edwards JC, Higgs GA.** Effect of indomethacin on swelling, lymphocyte influx, and cartilage proteoglycan depletion in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1989 Aug **48**:8 623-7.
- Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, Bordji K, Terlain B, Netter P, Gillet P.** Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Physiol.* 1997 Oct **273**:4 Pt 2 R1550-6.
- Piazza GA, Alberts DS, Hixson LJ, Paranka NS, Li H, Finn T, Bogert C, Guillen JM, Brendel K, Gross PH, Sperl G, Ritchie J, Burt RW, Ellsworth L, Ahnen DJ, Pamukcu R.** Sulindac sulfone inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels. *Cancer Res* 1997 Jul 15 **57**:14 2909-15.
- Piazza GA, Rahm AK, Finn TS, Fryer BH, Li H, Stoumen AL, Pamukcu R, Ahnen DJ.** Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res* 1997 Jun 15 **57**:12 2452-9.
- Piazza GA, Rahm AL, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH, Brendel K, Burt RW, Alberts DS, Pamukcu R.** Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1995 Jul 15 **55**:14 3110-6.
- Picot D, Loll PJ, Garavito RM.** The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 1994 Jan 20 **367**:6460 243-9.
- Pinto DJ, Batt DG, Pitts WJ, Petratis JJ, Orwat MJ, Wang S, Jetter JW, Sherk SR, Houghton GC, Copeland RA, Covington MB, Trzaskos JM, Magolda RL.** Terphenyl cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: optimization of the central ring and o-biphenyl analogs. *Bioorg Med Chem Lett.* 1999 Apr 5 **9**:7 919-24.
- Pond MJ, Nuki G.** Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis.* 1973 Jul **32**:4 387-8.
- Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC.** Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *J Exp Med.* 1996 Sep 1 **184**:3 883-91.

Figure 1A

Control



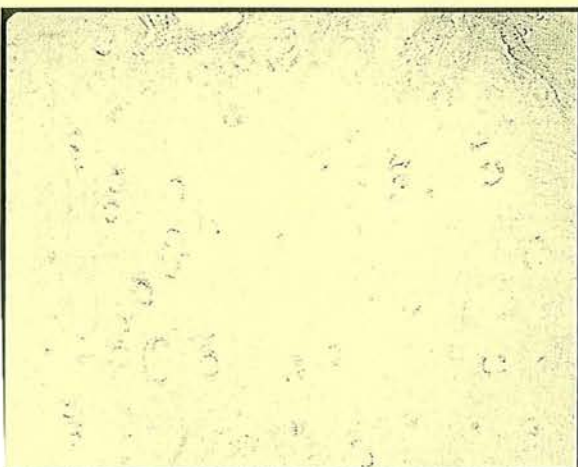
OA



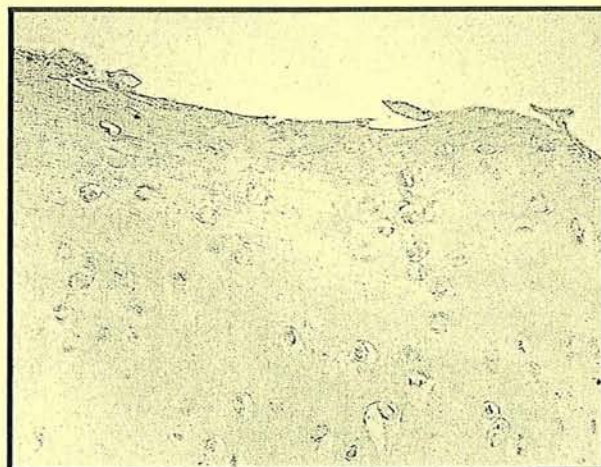
L-NIL (10 mg/kg)

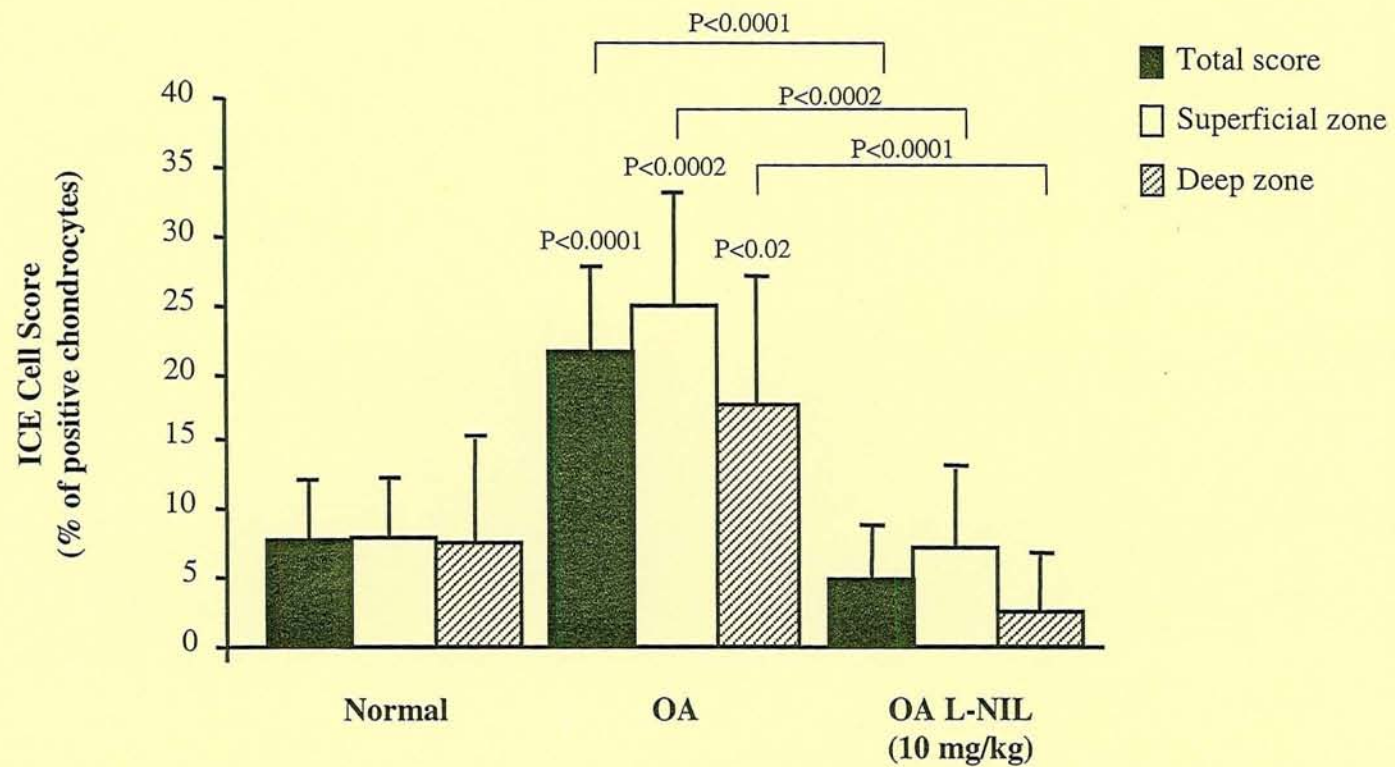


Immunoabsorbed



Non-specific IgG





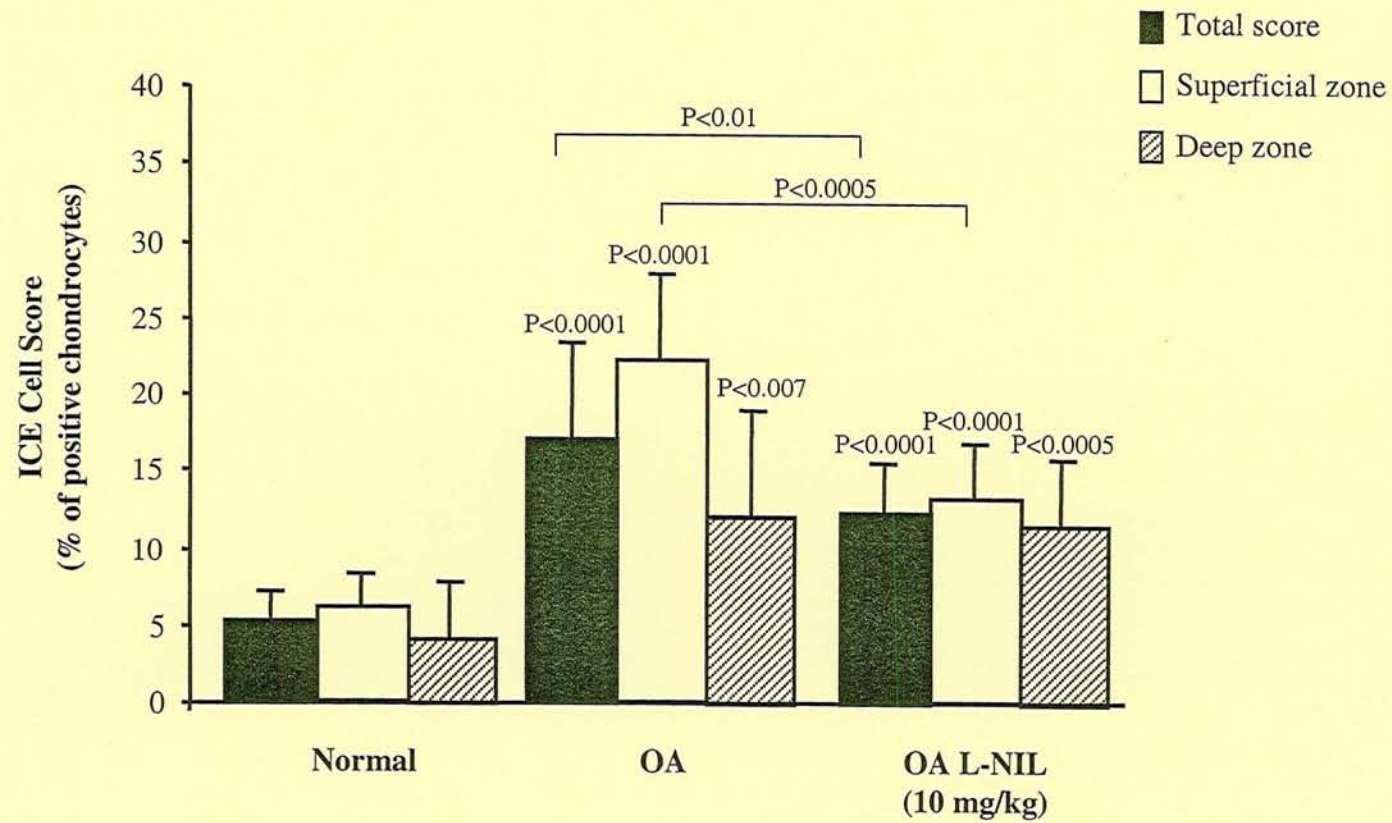
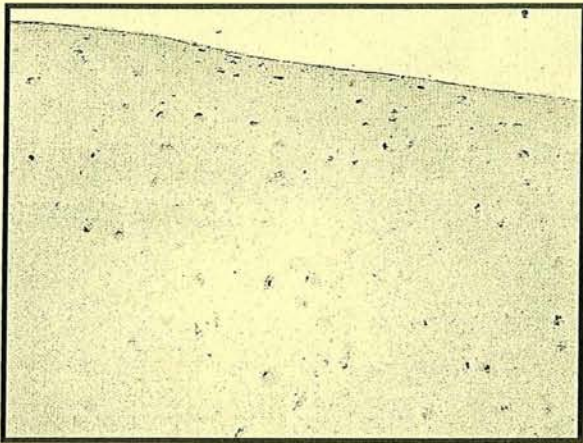
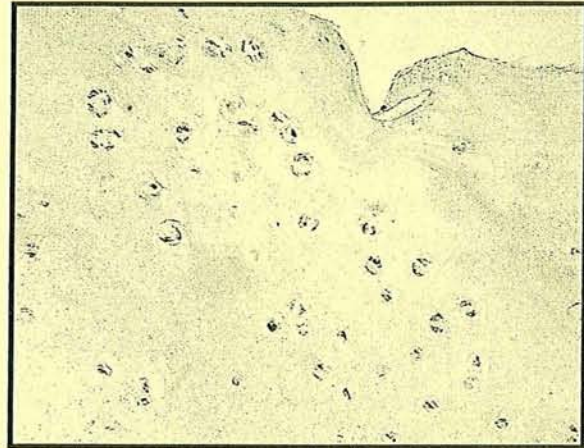


Figure 2A

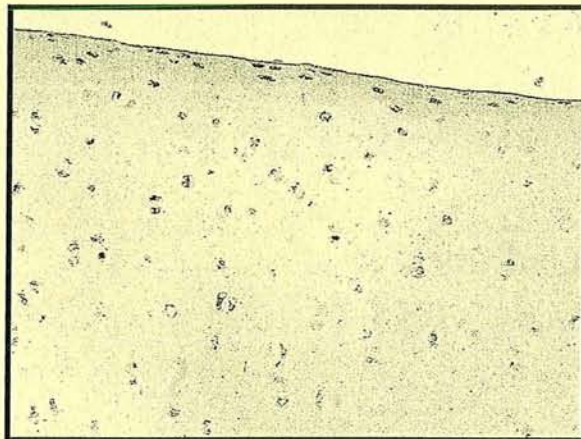
Control



OA



L-NIL 10 mg/kg

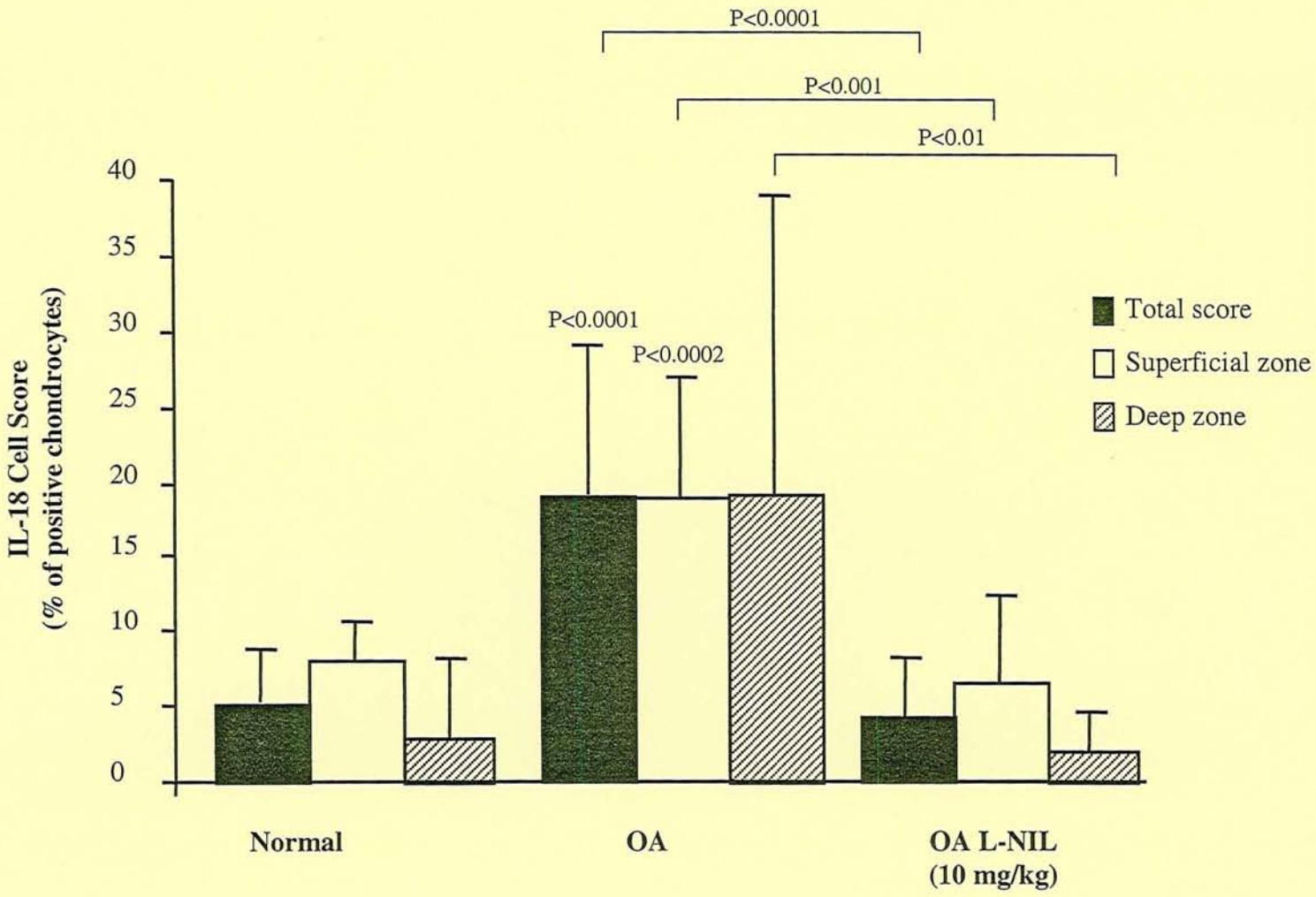


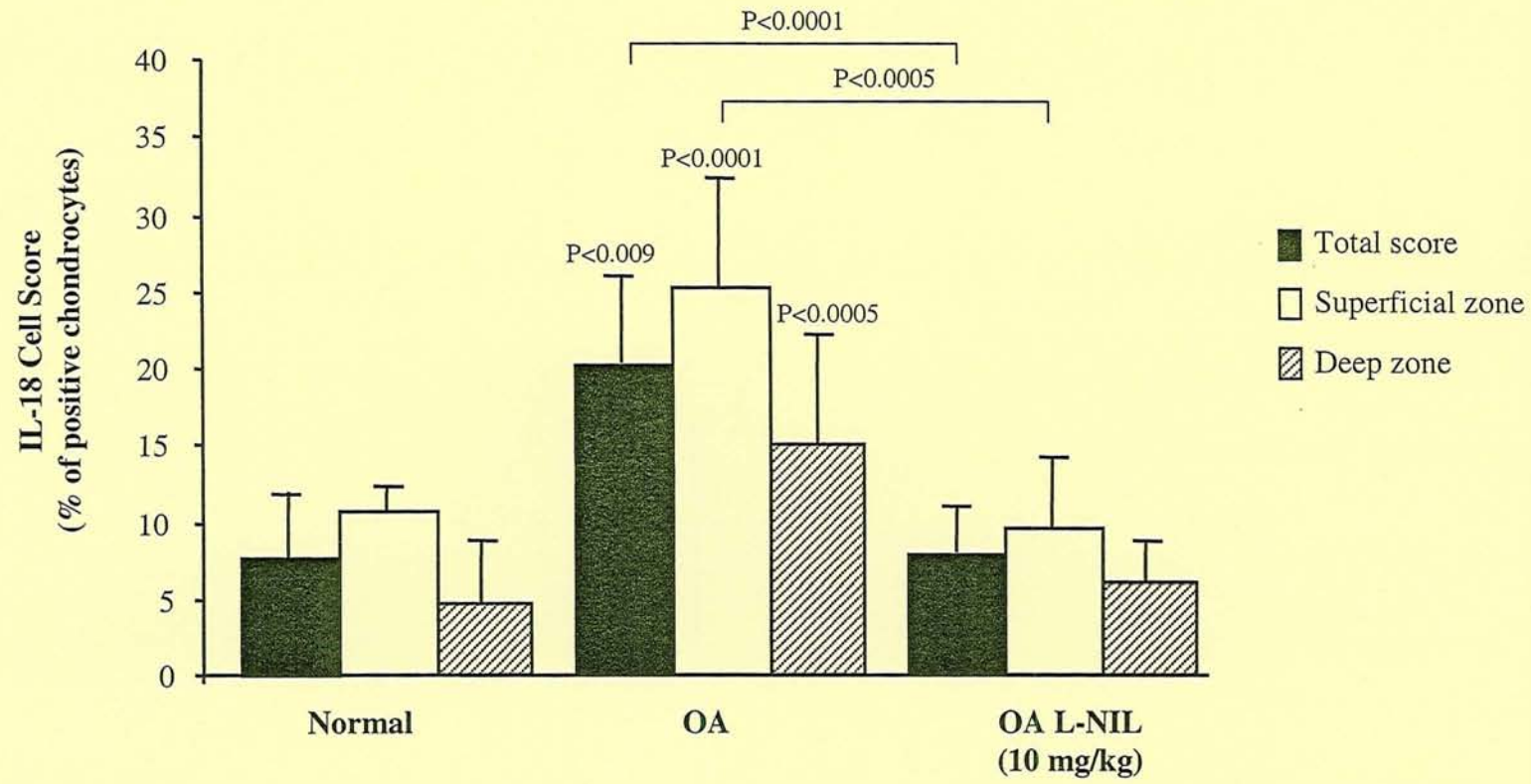
Immunoabsorbed



Non-specific IgG







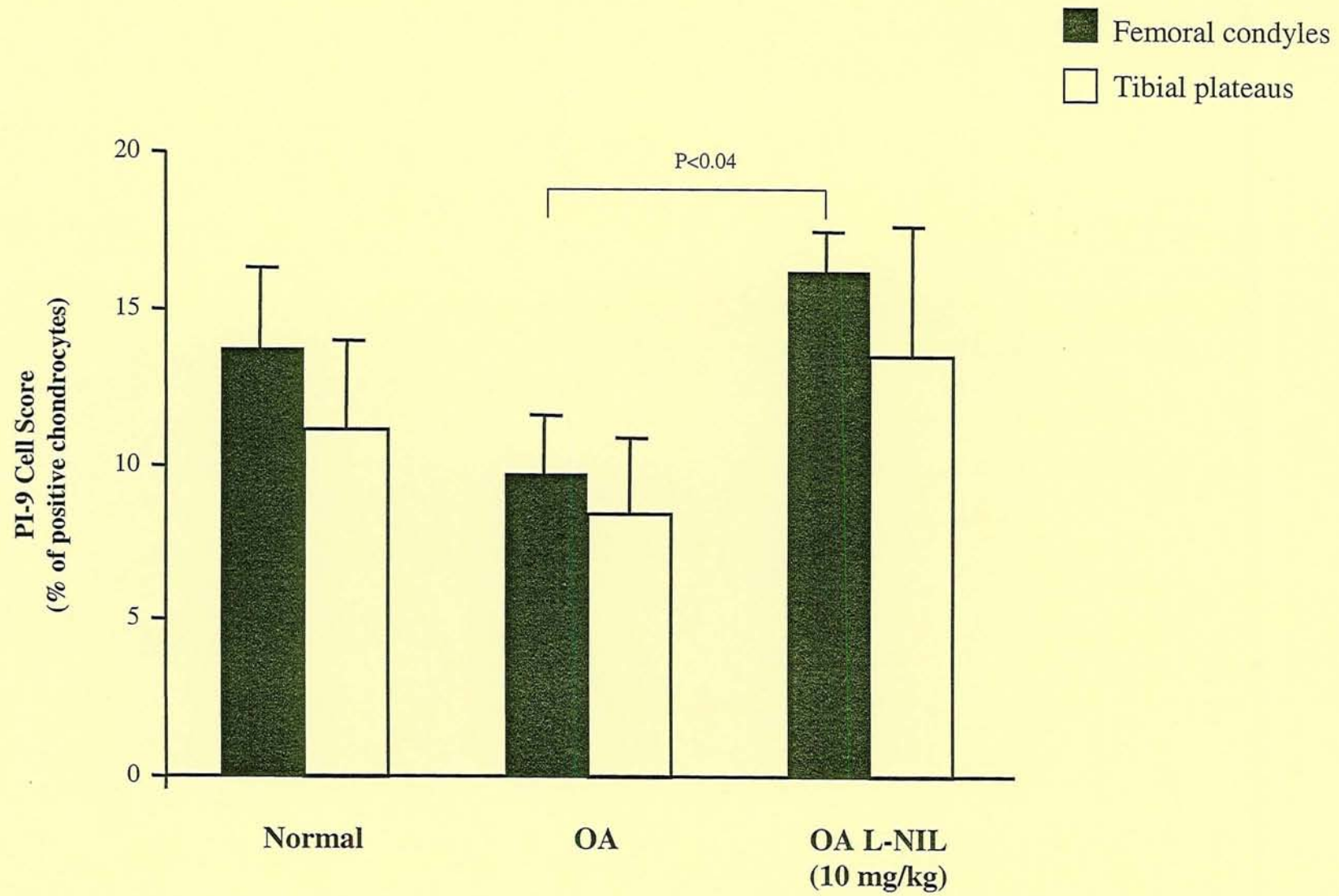
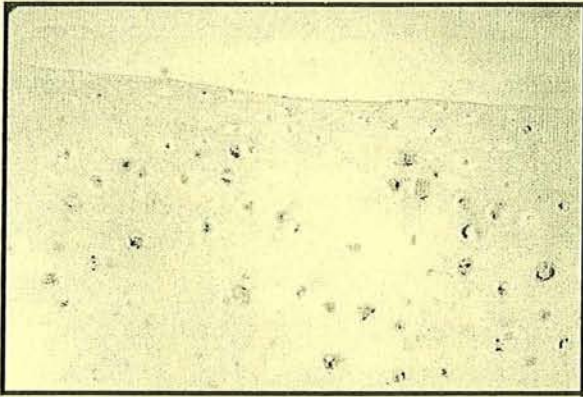
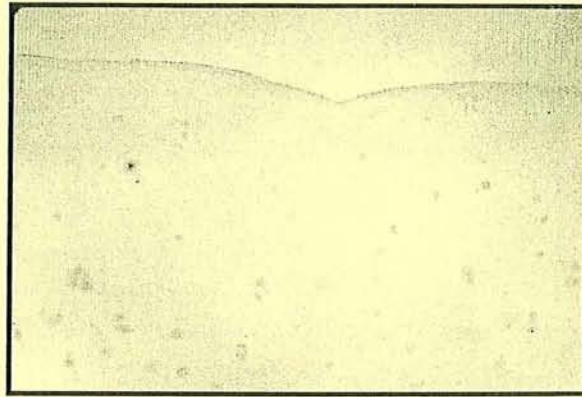


Figure 4A

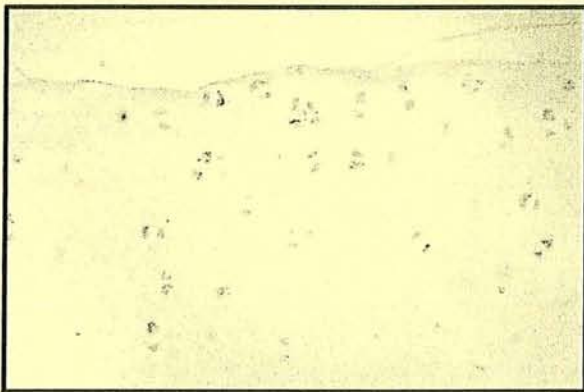
OA Control



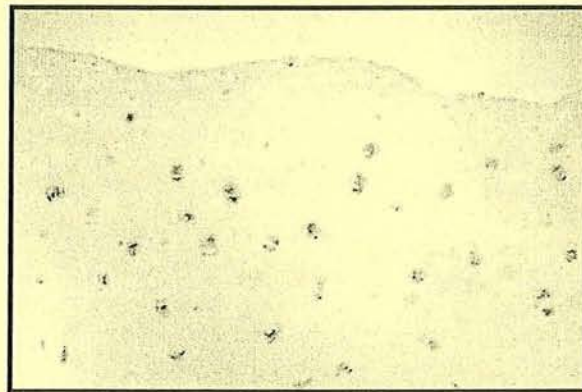
SB 202190
(10 μ M)



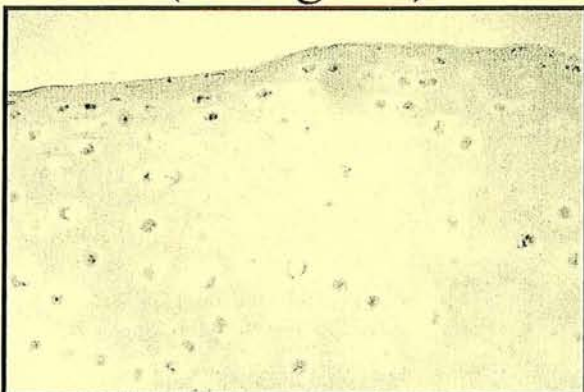
PD 98059
(100 μ M)



L-NIL
(50 μ M)

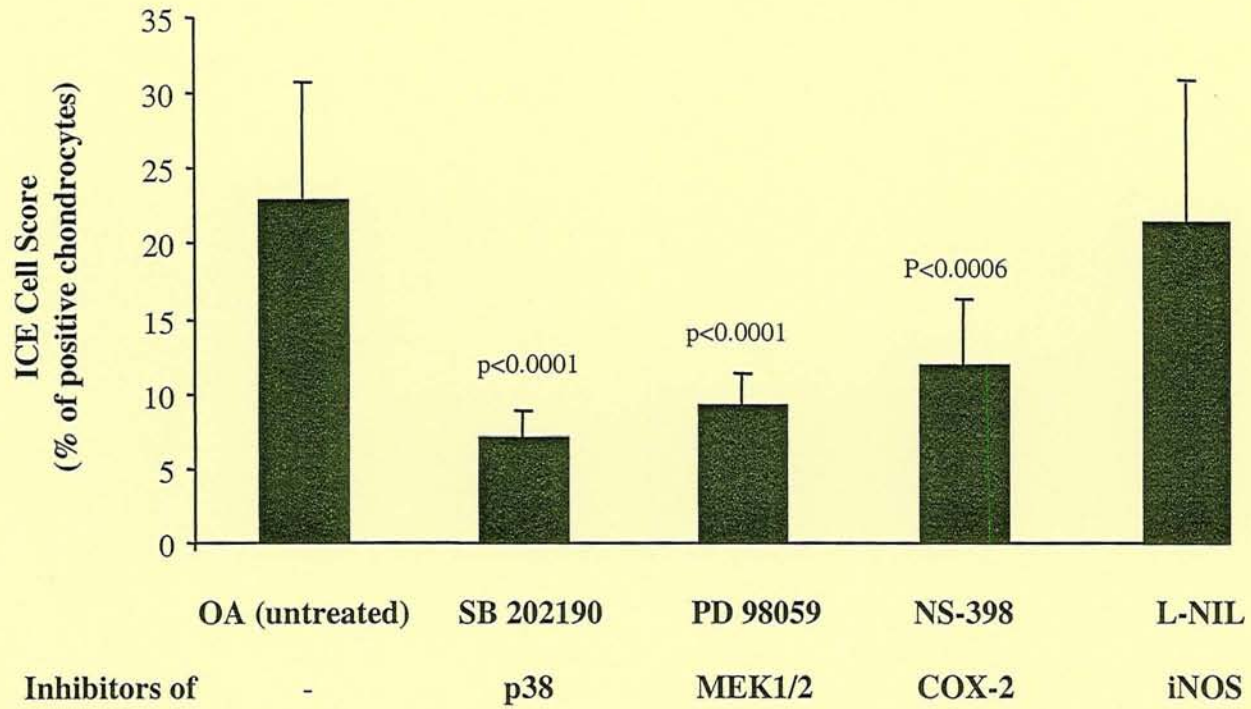


NS-398
(10 ng/ml)

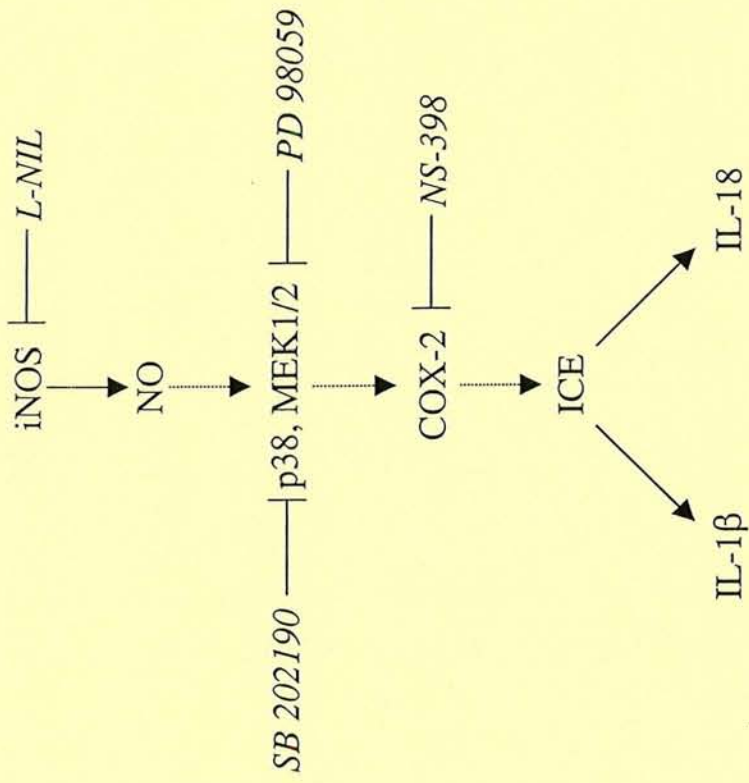


SN-50
(50 μ M)





Boileau et al, Figure 5



Prénom, Nom :

Christelle BOILEAU



Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER *thèse N° 662*

Nancy, le *2 avril 2002*

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



RESUME

Les AINS constituent l'une des classes thérapeutiques les plus utilisées et restent le traitement symptomatique de première intention dans les pathologies articulaires, inflammatoires (arthrite) ou dégénératives (arthrose). Il est largement admis que leur principal mécanisme d'action consiste à inhiber la biosynthèse des PGs par la COX. Cependant, leur utilisation s'accompagne d'effets secondaires importants, notamment au niveau gastro-intestinal. La mise en évidence de deux isoformes de COX aux fonctions distinctes a permis de décrire des profils de sélectivité d'inhibition des deux isoformes de COX différents pour les AINS classiques (d'après des modèles d'étude cellulaires). Ceci a également permis d'émettre une hypothèse pouvant paraître simpliste : l'inhibition de COX-1, isoforme constitutive est délétère alors que l'inhibition de COX-2 inductible, notamment au cours de l'inflammation, est bénéfique. COX-2 est donc devenue une cible thérapeutique de choix et de nouvelles molécules ont été développées avec des pouvoirs inhibiteurs de COX-2 très importants, et par conséquent avec une tolérance notamment digestive accrue.

La première partie de ce travail s'est attachée à étudier la pertinence de la sélectivité d'inhibition des isoenzymes de la COX dans des modèles mimant des conditions cliniques d'utilisation des AINS, c'est-à-dire une administration orale réitérée du médicament au cours du processus arthritique. Cette approche devait permettre d'étudier l'influence de la maladie arthritique sur la tolérance digestive aux AINS et de pouvoir mesurer les pouvoirs inhibiteurs des molécules dans les tissus cibles. Nous avons également mesurer l'effet de ces traitements sur l'anabolisme des protéoglycanes du cartilage. Une approche comparative entre des AINS classiques et des inhibiteurs plus ou moins sélectifs de COX-2 a été entreprise. Un inhibiteur réputé préférentiel de COX-2 (Méloxicam) et un inhibiteur réputé sélectif de COX-2 (Célécoxib) ont été comparé au naproxène, AINS classique dans des modèles d'arthrite aiguë ou chronique, avec des composantes locale ou systémique.

La seconde partie de cette étude avait pour principal objectif d'étudier les conséquences d'une inhibition plus ou moins sélective de la COX sur le cartilage articulaire au cours du processus arthrosique. Cette étude s'est plus particulièrement intéressé aux effets des traitements sur la sévérité de l'atteinte arthrosique, la survie chondrocytaire et l'anabolisme du cartilage dans la mesure où des AINS ayant une tolérance digestive améliorée sont susceptibles d'être administrés au long cours chez des patients souffrant d'arthrose. Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 se positionnent, en effet, plus que jamais, comme une alternative au paracétamol. Cependant, ils ne doivent pas produire d'effets délétères sur le cartilage. Dans cette partie de l'étude nous souhaitons donc mesurer l'impact des AINS sur le métabolisme du cartilage *in vivo*. Nous nous sommes intéressés aux effets de deux molécules, le rofécoxib, inhibiteur sélectif de COX-2 et le ML-3000, inhibiteur mixte COX/5-LOX, sur le cartilage. Pour cela, nous avons fait appel à des modèles expérimentaux mimant une atteinte dégénérative du cartilage articulaire (arthrose induite par section ligamentaire ou par injection de monoiodoacétate). Nous avons plus particulièrement étudié les modifications métaboliques du cartilage (synthèse des protéoglycanes) et la survie cellulaire (apoptose chondrocytaire).

Cette étude a permis de démontrer l'équivalence d'efficacité d'inhibiteurs ayant des profils de sélectivité différents pour COX-2 dans des modèles expérimentaux d'arthrite. Il a été possible de mettre en évidence la chondroneutralité de ces inhibiteurs sur le cartilage articulaire dans ces mêmes modèles. L'inhibiteur sélectif de COX-2 s'est avéré chondroneutre dans le modèle d'arthrose au MIA et sans effet aggravant sur la composante apoptotique. Par contre, l'inhibiteur mixte COX/5-LOX nous a permis de créer une chondroprotection expérimentale dans le modèle d'arthrose par section ligamentaire, avec un effet anti-apoptotique marqué.