Mécanismes d'action des AINS en relation avec la prolifération cellulaire et l'apoptose

Mikaël Daouphars

▶ **To cite this version:**

Mikaël Daouphars. Mécanismes d'action des AINS en relation avec la prolifération cellulaire et l'apoptose. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2004. Français. NNT : 2004NAN10258 . tel-01748667

HAL Id: tel-01748667

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748667

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

B

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I
2004

ECOLE DOCTORALE " BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT "

THESE

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

Présentée et soutenue publiquement
Le 8 novembre 2004

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

Mention "Sciences du Médicament"

Par

Mikaël DAOUPHARS

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

Sujet :

Mécanismes d'action des AINS en relation avec la prolifération cellulaire et l'apoptose

JB 3087

MEMBRES DU JURY

Juges :	J.-L. MERLIN	Professeur
	J.-Y. JOUZEAU	Professeur
Rapporteurs :	G. THIEFIN	Professeur
	B. CHAUFFERT	Professeur

BU PHARMA-ODONTOL
104 067843 8

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Yves Jouzeau qui a initié et soutenu ce projet tout au long de sa réalisation. Ses grandes connaissances méthodologiques et pharmacologiques, sa rigueur scientifique ainsi que son enthousiasme ont beaucoup contribué à l'aboutissement de cette thèse. Je lui témoigne ici toute ma gratitude et ma plus sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Louis Merlin pour son accueil dans son unité de recherche et pour avoir rendu possible la réalisation d'une partie de ce travail. Qu'il soit assuré de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur Bruno Chauffert de m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse. Qu'il soit assuré de ma profonde considération et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur Gérard Thiéfin pour l'honneur qu'il me fait de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Professeur Bernard Terlain pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et ses conseils scientifiques. Qu'il soit assuré de mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Docteur Alexandre Benani pour son soutien, ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie Madame Meriem Koufany et Madame Sophie Marchal pour leur aide technique précieuse, ainsi que l'ensemble du personnel du Laboratoire.

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

A mes parents,

A Alexandre et Emmanuelle,

A Pierre et l'ensemble de ceux qui m'ont apporté affection et soutien,

je dédie cette thèse.

LISTE DES PUBLICATIONS

PAIRET M, NETTER P, JOUZEAU JY, BOUVENOT G, BERDEAUX A, BERTIN P, BONNET J, BOURIN M, CAUSSADE F, CHARPIGNY G, CHAZELLE F, DAOUPHARS M, DAVID N, DRICI MD, DROPSY R, GUERIN V, JOUBERT JM, LAROUSSE C, NEANT F, PICOT D, RIENDEAU D, SASSARD J, TERLAIN B.
Inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2 (COX-2) : intérêts et limites.
Thérapie 1999, 54 (4) : 433-45

JOUZEAU JY, BLAIN H, DAOUPHARS M, GILLET P.
L'inhibition sélective de la cyclo-oxygénase de type 2 : une nouvelle vision des anti-inflammatoires non stéroïdiens.
La Lettre de l'Hépato-gastroentérologue 2001, 2(IV) : 92-96

JOUZEAU JY, DAOUPHARS M, BENANI A, NETTER P.
Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase
Gastroentérologie Clinique et Biologique 2004, 28 (3) : C7-17

JOUZEAU JY, DAOUPHARS M, NETTER P.
Place des coxibs dans l'arsenal thérapeutique : quelques certitudes et beaucoup de doutes
Thérapie 2004, 59 (2) : 207-11

DAOUPHARS M, KOUFANY M, BENANI A, MARCHAL S, MERLIN JL, NETTER P, JOUZEAU JY.
Uncoupling of oxidative phosphorylation and Smac/DIABLO release are not sufficient to account for the pro-apoptotic effect of sulindac sulfide in human colorectal cancer cells
International Journal of Oncology (accepté pour publication, n° 5978-IJO)

LISTE DES ABREVIATIONS

3'-UTR : Partie 3' non traduite
AA : Acide arachidonique
aa : Acide aminé
AAS : Acide acétylsalicylique
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ANT : Translocateur de nucléotides à adénine
AOM : Azoxyméthane
Apaf-1 : *Apoptotic protease activating factor*
APC : *Adenomatous polyposis coli*
Arg : Arginine
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
Asn : Asparagine
CI_{50} : Concentration inhibant l'activité enzymatique de 50%
COX : Cyclooxygénase
CRE : *cAMP responsive element* ou élément de réponse à l'AMPc
CsA : Cyclosporine A
CXB : Célécoxib
Cys : Cystéine
DAG : Diacylglycérol
DE : Dose efficace
DMEM : Milieu d'Eagle modifié par Dulbecco
DMEM/F12 : Milieu d'Eagle modifié par Dulbecco/Mélange nutritif F12 (1:1)
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EDRF : *Endothelial-derived relaxing factor*
EGF : *Epidermal Growth Factor*
FAP : *Familial Adenomatous Polyposis*
FCCP : carbonyl cyanide *p*-trifluorométhoxyphényl hydrazone
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
Gln : Glutamine
Glu : Acide glutamique
Gly : Glycine
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
HETE : Hydroxyeicosatétraénoïque
HPETE : Hydroxyperoxyeicosatétraénoïque
His : Histidine
HMGCoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
IAPs : *Inhibitor of apoptosis proteins*
ICE : Enzyme de conversion de l'interleukine-1β
IFNγ : Interféron γ
IL-1 : Interleukine-1
Ile : Isoleucine
IND : Indométacine
IP_3 : Inositol triphosphate
JC-1 : 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazol-carbocyanine iodide
JNK : Kinase c-Jun
kb : kilo base

KPF : Kétoprofène
LDH : Lactate deshydrogénase
Leu : Leucine
LPS : Lipopolysaccharides
LOX : Lipoxygénase
LT : Leucotriène
Min : *Multiple Intestinal Neoplasia*
MMP : *Matrix MetalloProteinases* ou métalloprotéases matricielles
NADPH : β-nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NF-IL6 : Facteur nucléaire de l'IL-6
NF-κB : Facteur nucléaire de κB
NO : Monoxyde d'azote
PCR : Amplification par polymérisation en chaîne
PDGF : *Platelet-derived Growth Factor*
PG : Prostaglandine
PGE_2 : Prostaglandine E_2
$PGF_{2\alpha}$: Prostaglandine $F_{2\alpha}$
PGES : Prostaglandine E synthase
PGH_2 : Prostaglandine H_2
PGHS : Prostaglandine H synthase
PGI_2 : Prostaglandine I_2 ou Prostacycline
pKa : pH pour lequel les formes ionisée et non ionisée sont en proportions égales
Phe : Phénylalanine
PLA_2 : Phospholipase A_2 (*c* : cytosolique, *s* : secrétée)
PPAR : Récepteurs activés par les prolifférateurs de peroxysomes
Pro : Proline
RT : Transcription inverse
SDS : Sodium dodécyl sulfate
Ser : Sérine
SS : Sulfure de sulindac
SVF : Sérum de veau fœtal
$t_{1/2}$: Demi-vie
TCF : *T-cell factor*
TNFα : *Tumor Necrosis Factor α*
Tx : Thromboxane
Tyr : Tyrosine
UTR : *Untranslated Region* ou région non traduite
Val : Valine
VDAC : *Voltage-dependent anion channel*

TABLE DES MATIERES

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

I. LES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIENS 6

I.A. ISOENZYMES DE LA CYCLOOXYGENASE 7

I.A.1. Structures des gènes COXs 7

I.A.2. Régulation de l'expression des gènes COXs 8

I.A.3. Les protéines COXs 10

I.A.4. Localisation cellulaire et distribution tissulaire 13

I.A.5. Activité enzymatique 13

I.A.6. Fonction : de la synthèse des prostaglandines aux rôles physiopathologiques des COXs 15

I.A.7. Effets biologiques des prostaglandines 22

I.B. CLASSIFICATION CHIMIQUE DES AINS 26

I.C. MECANISMES D'INHIBITION DES CYCLO-OXYGENASES PAR LES AINS 29

I.D. NOUVELLE CLASSIFICATION DES AINS SELON LEUR SELECTIVITE D'INHIBITION DES ISOENZYMES DE LA COX 32

I.E. LES INHIBITEURS SELECTIFS DE LA COX-2 34

I.E.1. Les éthers diaryl- et aryl-hétéroaryles 34

I.E.2. Les hétérocycles diaryles 34

I.E.3. Base de la sélectivité d'inhibition des COXs par les coxibs 37

I.F. L'HYPOTHESE COX-3 39

I.G. AUTRES MECANISMES D'ACTION DES AINS 39

I.G.1. Découplage de la phosphorylation oxydative 39

I.G.2. Action sur les fonctions des polynucléaires neutrophiles 40

II. L'APOPTOSE OU MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE **41**

II.A. DEFINITION 41

II.B. DESCRIPTION GENERALE 41

II.C. MODELE DE MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE : *CÆNORHABDITIS ELEGANS* 42

II.D. MECANISMES MOLECULAIRES DE LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE 43

II.D.1. Les caspases : effecteurs centraux 43

II.D.2. Voies d'induction de l'apoptose 48

II.D.3. Les régulateurs de la mort cellulaire 52

II.E. METHODES D'ETUDE DE L'APOPTOSE 55

III. RELATIONS ENTRE CANCER COLORECTAL, PROSTAGLANDINES ET AINS **56**

III.A. DONNEES GENERALES SUR LE CANCER COLORECTAL 56

III.A.1. Epidémiologie 56

III.A.2. Histopathologie 56

III.A.3. Terrain 56
III.A.4. Pronostic 57
III.A.5. Classification 57
III.A.6. Bilan diagnostique et préthérapeutique 59
III.A.7. Stratégie thérapeutique 59
III.A.8. Chimioprévention du cancer colorectal 59
III.B. PRINCIPAUX MODELES ANIMAUX DE CANCER COLORECTAL 60
III.C. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES ET CLINIQUES 66
III.C.1. Polyposes (adénome) 66
III.C.2. Cancer colorectal (adénocarcinome) 67
III.D. BASES PHYSIOPATHOLOGIQUES DU ROLE DES PROSTAGLANDINES DANS LE CANCER COLORECTAL 70

OBJECTIF DU TRAVAIL 74

ETUDE EXPERIMENTALE 76

I. MATERIEL ET METHODES 77
I.A. LIGNEES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE 77
I.B. REACTIFS ET SUBSTANCES CHIMIQUES TESTEES 77
I.B.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens 77
I.B.2. Autres réactifs 77
I.B.3. Anticorps pour Western Blot 78
I.C. ETUDE DU METABOLISME CELLULAIRE 78
I.D. ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE 79
I.E. ETUDE DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE 79
I.F. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE COX-1 ET COX-2 79
I.G. ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE 80
I.H. ETUDE DE L'APOPTOSE 81
I.H.1. Détection du pic subG1 81
I.H.2. Marquage par l'Annexine V 81
I.H.3. Technique Tunel (TdT mediated digoxigenin-dUTP nick and end labelling) 82
I.H.4. Etude de l'activité des caspases 3 et 9 83
I.I. ETUDE DE LA MITOCHONDRIE 83
I.I.1. Dosage de l'ATP intracellulaire 83
I.I.2. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$) 83
I.I.3. Détection de l'épitope mitochondrial 7A6 84
I.I.4. Analyse en Western Blot de la libération du cytochrome c et de Smac/DIABLO 85

I.J. ETUDE STATISTIQUE 85

II. RESULTATS **86**

II.A. ETUDE PRELIMINAIRE DES LIGNEES CELLULAIRES 86

II.A.1. Courbes de prolifération et activité métabolique 86

II.A.2. Etude de la différenciation cellulaire 88

II.A.3. Etude de l'expression des COXs par Western Blot 88

II.B. ETUDE DU POUVOIR INHIBITEUR DES AINS 89

II.B.1. Effet des AINS sur le métabolisme cellulaire 89

II.B.2. Effet des AINS sur la prolifération cellulaire 95

II.B.3. Effets des AINS sur la différenciation cellulaire 96

II.C. EFFETS DES AINS SUR LE CYCLE CELLULAIRE 100

II.D. EFFETS DES AINS SUR L'APOPTOSE 105

II.D.1. Etude en immunocytochimie 105

II.D.2. Effets des AINS sur la fragmentation nucléaire (détection du pic subG$_1$) 107

II.D.3. Effets des AINS sur l'apoptose : Technique TUNEL par cytométrie en flux 109

II.D.4. Effets des AINS sur l'activité des caspases 3/9 (méthode fluorimétrique) 110

II.D.5. Effets des AINS sur l'externalisation des phosphatidylsérines membranaires (marquage par l'annexine V mesurée par cytométrie en flux) 110

II.E. EFFETS DES AINS SUR LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES 113

II.E.1. Effets des AINS sur le taux intracellulaire d'ATP 113

II.E.2. Effets des AINS sur le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$) 114

II.E.3. Effets des AINS sur le démasquage de l'épitope 7A6 118

II.E.4. Effets des AINS sur la libération de protéines mitochondriales pro-apoptotiques 121

II.E.5. Effets de la ciclosporine sur le dysfonctionnement mitochondrial induit par les AINS 121

III. DISCUSSION **124**

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **132**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **137**

ANNEXES **161**

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIENS

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (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 vient d'être 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 rhumatismales, 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 16500 décès par an aux Etats-Unis chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde ou d'ostéoarthrite, autant que le nombre de morts par SIDA en 1997 dans le même pays [Wolfe et coll, 1999]. Les effets indésirables digestifs et, à un degré moindre, rénaux demeurent la principale limitation de l'utilisation prolongée des AINS classiques en rhumatologie [Pairet et coll, 1999].

Il y a près de 30 ans, les travaux de John Vane [Vane, 1971] ont montré que les anti-inflammatoires non stéroïdiens diminuent la biosynthèse des prostaglandines (PG) en inhibant la cyclooxygénase (COX). Cette découverte a permis de proposer un mécanisme d'action unique et cohérent pour cette famille relativement hétérogène de molécules. L'étude du pouvoir inhibiteur sur la cyclooxygénase a d'ailleurs permis de sélectionner des produits dont plus de 40 ont atteint le stade de la commercialisation [Cronstein et Weissmann, 1995].

La cyclooxygénase, enzyme catalysant la biosynthèse des endoperoxydes cycliques à partir de l'acide arachidonique (AA) pour former les prostaglandines, a longtemps été considérée comme unique. Cependant, les propriétés inhibitrices des AINS varient selon les régions de l'organisme. Une telle spécificité tissulaire des AINS aurait pu être liée à une distribution tissulaire variable, mais a également fait émerger l'idée de plusieurs formes moléculaires du système de production de prostaglandines [Lysz et Needleman, 1982; Vane, 1972]. Par ailleurs, la contradiction entre l'efficacité clinique des salicylés non acétylés et leur faible pouvoir inhibiteur sur la COX a renforcé l'hypothèse de plusieurs enzymes COX et de l'existence de mécanismes d'action additionnels pour les AINS [Abramson et Weissmann, 1989].

Au début des années 90, plusieurs études montrent alors que l'activité de la COX dans différents types cellulaires augmente sous l'effet des endotoxines, des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance, des hormones et des procarcinogènes. Cette augmentation d'activité est liée à une synthèse de protéines *de novo*, et peut être inhibée par les corticostéroïdes. Ceci a ainsi fait émerger le concept d'activités COXs constitutionnelle et inductible, dépendant des isoformes respectives COX-1 et COX-2 [Jouzeau et coll, 1997].

I.A. ISOENZYMES DE LA CYCLOOXYGENASE

I.A.1. Structures des gènes COXs

La structure primaire de la COX-1 ovine a été obtenue par clonage de l'ADNc en 1989 [DeWitt et Smith, 1988; Merlie et coll, 1988; Yokoyama et coll, 1988]. Par la suite, la séquence complète en acides aminés de la COX-1 humaine a été déduite par clonage et analyse de la séquence de l'ADN génomique humain codant pour l'enzyme [Yokoyama et Tanabe, 1989]. Le gène de COX-1 est un gène de 22kb avec 11 exons, localisé sur le chromosome 9 chez l'homme [Funk et coll, 1991] (Figure 1). Il existe plusieurs éléments de régulation dans la région promotrice, comprenant deux motifs Sp1, deux sites AP-2, un motif NF-IL6 et une séquence GATA. En revanche, l'extrémité 5' ne contient pas de TATA box [Wang et coll, 1993] (Figure 2).

Le gène de COX-2 a été découvert en 1991, comme un gène de réponse primaire [Kujubu et coll, 1991; Xie et coll, 1991]. C'est un gène compact (8,3kb), avec 10 exons, localisé sur le chromosome 1 chez l'homme [Tay et coll, 1994] (Figure 1). La séquence de son ADNc présente 60% d'homologie avec celle du gène non inductible. Les exons des deux isoformes étant de longueurs similaires, la différence de taille entre les deux gènes ne relève que de celle des introns, ceux de COX-2 étant considérablement plus courts que ceux de COX-1. Plusieurs éléments de régulation transcriptionnelle sont retrouvés dans le promoteur de COX-2 : une TATA box, un motif NF-IL6, deux sites AP-2, trois sites Sp1, deux sites NF-κB, un motif CRE et une E-box. L'exon le plus grand du gène COX-2 code pour la totalité de la région 3' non traduite (3'-UTR), qui contient 17 copies de la séquence ATTTA, intervenant dans l'instabilité des ARNs [Appleby et coll, 1994] (Figure 2). L'ARNm de la forme inductible existe sous la forme de variants de 4,5kb, 4kb et 2,8kb alors que celui de la forme constitutionnelle mesure 2,8kb [Jones et coll, 1993] (Tableau I).

I.A.2. Régulation de l'expression des gènes COXs

L'activité enzymatique des COXs présente un renouvellement rapide, impliquant une régulation de l'expression de leur gène, que ce soit au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel.

a) Régulation de l'expression de COX-1

Le gène de COX-1 possède un promoteur caractéristique d'un gène domestique. Les sites Sp1 de la région 5' interviennent de façon constitutionnelle dans le maintien de l'activité basale du gène au niveau des cellules endothéliales [Xu et coll, 1997].

b) Régulation de l'expression de COX-2

L'expression du gène de COX-2 est fortement régulée, notamment par la nature hautement inductible de son promoteur. Le COX-2 est exprimé en réponse à :

- des facteurs pro-inflammatoires (IL-1, TNFα, IFNγ, LPS et TPA)
- des hormones (FSH, LH et œstrogènes)
- des facteurs de croissance (EGF, PDGF et FGF)
- des oncogènes (v-Src et v-Ras)

L'induction rapide de COX-2 fait intervenir différentes cascades de signalisation, notamment la cascade MAPK (mitogen-activated protein kinases, comprenant les sous-groupes de kinases ERKs, JNKs/SAPKs et p38 MAPK), ainsi que divers facteurs de transcription, dont NF-κB [Tanabe et Tohnai, 2002]. Les glucocorticoïdes interviennent dans l'inhibition de COX-2 à plusieurs niveaux. Ils sont responsables d'une augmentation d'expression des protéines IκB, inhibitrices de NF-κB, supprimant ainsi la synthèse d'ARNm de COX-2 médiée par NF-κB [Migita et coll, 2000]. Par ailleurs, les corticoïdes inhibent directement l'action d'un autre facteur de transcription, AP-1, bloquant ainsi la synthèse d'ARNm de COX-2 médiée par l'IL-1 [Gonzalez et coll, 2000]. Enfin, les glucocorticoïdes peuvent inhiber l'expression de COX-2 en diminuant la stabilité des ARNm de COX-2, en agissant sur leur région 3'-UTR.

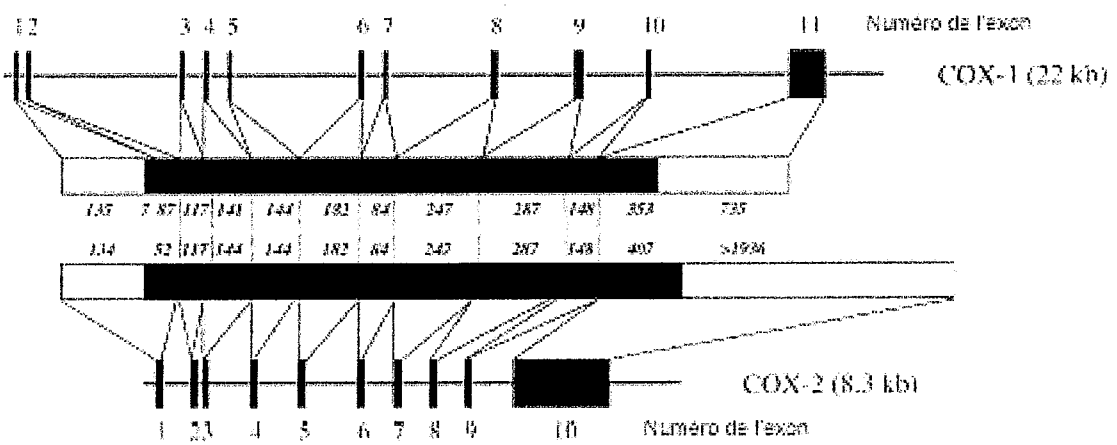


Figure 1 : Structure des gènes de COX-1 et de COX-2 humains et représentation schématique de leurs transcrits (ARNm) [Kosaka et coll, 1994]

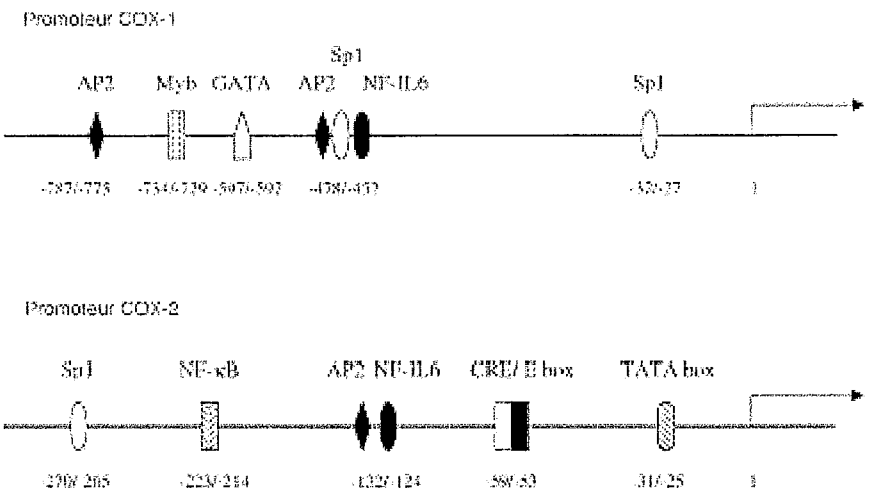


Figure 2 : Eléments de régulation au niveau des promoteurs des gènes COXs [Inoue et coll, 1995]

Tableau I : Comparaison des gènes COX-1 et COX-2

	COX-1	**COX-2**
Locus	9q32-q33.3	1q25.2-q25.3
Taille du gène	22 kb	8,3 kb
Nombre d'exon	11	10
Taille de l'ARNm	2,8 kb	4,6 kb
Nucléotides codants	1797 bp	1812 bp
Extrémité 5'	Pas de TATA box, riche en GC, motifs Sp1	Sites NF-κB, NF-IL6, CRE, E-box, TATA box
3'-UTR	0,7 kb	2 kb riche en séquences AUUUA (Shaw-Kamen)
Type d'expression	Constitutionnelle	Inductible

I.A.3. Les protéines COXs

a) Structure primaire

Les deux isoformes de la cyclooxygénase sont des protéines glycosylées. La COX-1 porte 3 ou 4 sites de glycosylation, ce qui lui confère une masse moléculaire apparente de 72 kDa. La COX-2 possède un site supplémentaire dans sa partie C-terminale dont la glycosylation partielle peut aboutir à une masse moléculaire apparente égale à 72 ou 74 kDa [Otto et Smith, 1994]. Les deux isoformes sont très similaires entre elles et selon les espèces. Leurs séquences primaires varient de 599 (Homme) [Yokoyama et Tanabe, 1989] à 602 acides aminés (aa) (souris) [Smith et coll, 1990] pour la COX-1 et de 603 (souris) à 604 aa (Homme) [Picot et coll, 1994] pour la COX-2. Les séquences en aa de différentes espèces sont identiques à environ 90% (entre 81 et 98 %) alors que l'on retrouve environ 60% d'identité entre les deux isoformes dans une espèce donnée [Xie et coll, 1992]. Les différences majeures de séquence entre les deux isoformes sont : la présence dans COX-1 de 17 aa supplémentaires du côté N-terminal, la présence, dans la séquence de COX-2, d'une proline supplémentaire après l'Ile^{106} et l'insertion d'une séquence supplémentaire de 18 aa en position C-terminale dans COX-2 [Herschman, 1996; Otto et Smith, 1995]. Les formes immatures des enzymes subissent un clivage peptidique lors de leur adressage, avec la perte du peptide signal. Certaines régions, notamment celles impliquées dans l'activée enzymatique, sont très fortement conservées. En effet, les résidus qui forment le canal hydrophobe, le site catalytique et les résidus immédiatement adjacents sont tous identiques à l'exception de deux variations : les isoleucines (Ile)^{434} et ^{523} de COX-1 sont remplacées, dans COX-2, par des valines (Val) en position 420 et 509 [Kurumbail et coll, 1996; Luong et coll, 1996].

b) Structures secondaire et tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle de la COX-1 ovine, résolue par cristallographie aux rayons X [Picot et coll, 1994] (Figure 3), a permis de montrer que la forme active de la COX est un homodimère asymétrique de forme ellipsoïdale et de dimension 99x65x55 Å. La COX-1 contient de nombreuses séquences hélicoïdales (40% de la protéine) et de petits feuillets ß, et peut être divisée en trois domaines structuraux distincts correspondant à des régions successives de la structure primaire : un module "EGF-like", un domaine de liaison à la membrane et un domaine catalytique.

Module "EGF-Like"

En position *N*-terminale, les résidus 34 à 72 forment un petit domaine constitué de deux doubles feuillets reliés par trois ponts disulfures et dont l'arrangement rappelle celui de l'EGF (Epidermal Growth Factor). Les deux modules "EGF-like" du dimère COX-1 sont en contact étroit et leur rôle principal serait d'assurer la reconnaissance entre les monomères et de permettre le maintien stable du dimère.

Domaine de liaison à la membrane

Ce domaine contient les aa 73 à 116 et est formé par quatre hélices α (A, B, C, D) hautement amphiphiles. Ces hélices s'insèrent, grâce à des liaisons hydrophobes, seulement dans le feuillet interne de la bicouche phospholipidique, créant grâce à des liaisons hydrophobes un motif original d'ancrage de l'enzyme dans la membrane du réticulum endoplasmique. La conséquence directe de ce mode d'attachement est la localisation totale de la protéine dans la partie luminale du réticulum endoplasmique. Cette localisation autoriserait le passage direct des acides gras membranaires vers les sites enzymatiques voisins.

Domaine catalytique

C'est le domaine le plus important en masse (117 à 600 aa) et il comprend les sites actifs peroxydasique et dioxygénasique (Figure 4). Ce domaine a un degré élevé d'homologie structurale avec les protéines membres de la famille des peroxydases malgré une faible homologie de séquence (20% d'identité) [Picot et coll, 1994]. Les motifs structuraux du site enzymatique interagissent étroitement avec l'hélice D du motif de liaison à la membrane, et l'ensemble s'organise en un long canal hydrophobe qui permet à l'AA d'avoir un accès direct aux sites catalytiques à partir de la membrane [Blake, 1994]. Plusieurs aa présents dans ce canal jouent un rôle important. L'Arg^{120} et la Glu^{524} forment un pont ionique, la Tyr^{355} est en étroite relation avec l'Arg^{120} dans la partie médiane du canal, la Ser^{530} est le site d'acétylation de l'aspirine [DeWitt et coll, 1990], enfin, la Tyr^{385} est le support de l'activité oxygénasique grâce aux radicaux tyrosyl générateurs de peroxydes [Shiff et coll, 1995]. Par ailleurs, les repliements de la protéine font que le site d'acétylation par l'aspirine (Ser^{530}) est situé au voisinage immédiat du site catalytique oxygénasique (Tyr^{385}), de sorte que ces deux sites se trouvent au sommet du canal [Picot et coll, 1994].

La résolution plus récente de la structure tridimensionnelle de COX-2 [Kurumbail et coll, 1996; Luong et coll, 1996] par la cristallographie aux rayons X a permis de montrer que la structure de la COX-2 humaine ou murine est superposable à celle de la COX-1 malgré des différences de structure primaire comme un peptide signal COX-1 plus grand ou la présence, dans COX-2, d'une proline supplémentaire. L'addition de ces résidus ne modifie que localement la structure de l'enzyme, sans affecter sa topologie globale.

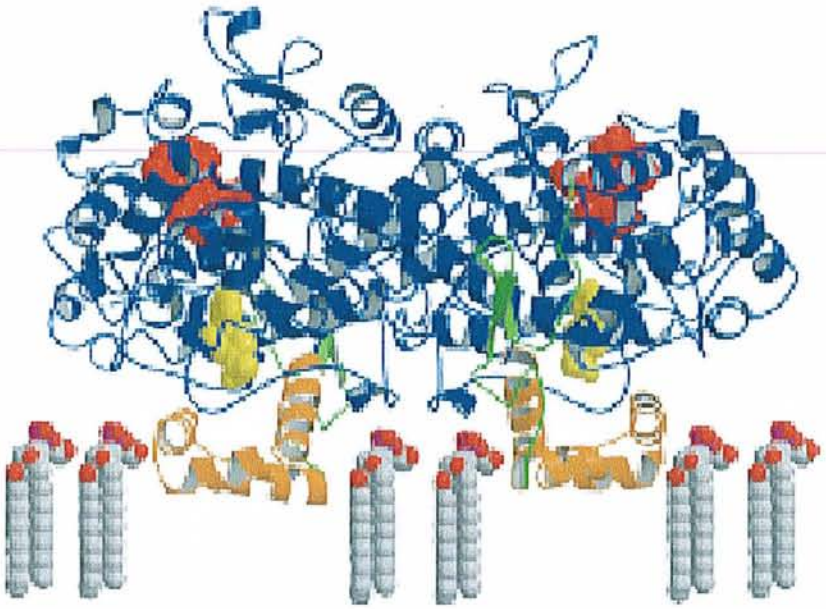


Figure 3 : Structure de la PGHS-1 ovine. Homodimère ancré dans une membrane plasmique : molécule de flurbiprofène (jaune) au niveau du site actif, domaine EGF-like (vert), domaine de liaison à la membrane (ocre), domaine catalytique (bleu), hème (rouge) [d'après Picot, 1994 et Smith, 2000].

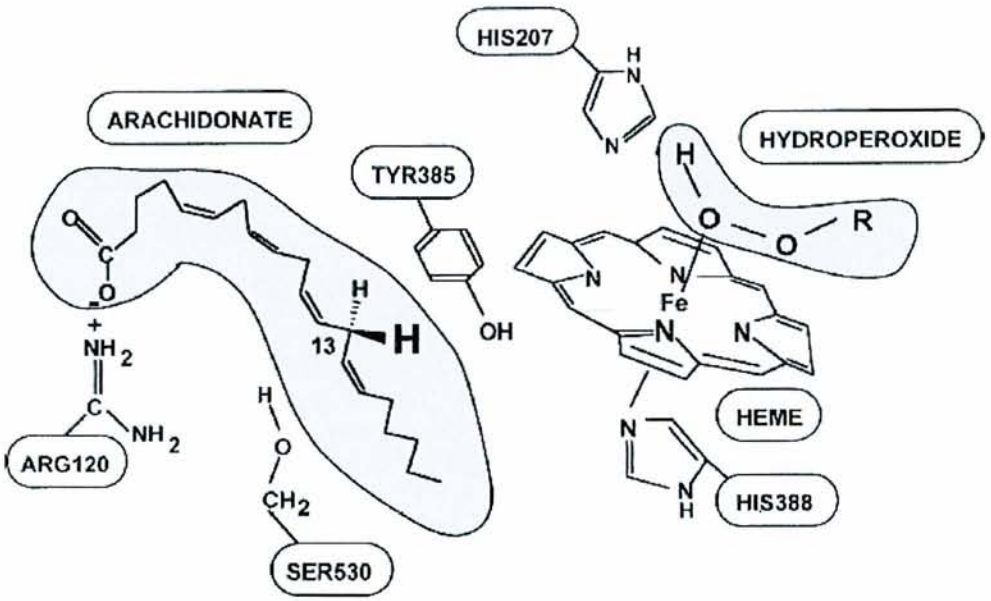


Figure 4 : Interrelations cyclooxygénase – peroxydase et résidus importants [Smith et coll, 2000b].

En revanche, la substitution de l'Ile^{523} en Val^{509} permet la formation d'une poche latérale (« side pocket ») dans le site actif de COX-2. C'est la faible taille de la chaîne latérale de la Val couplée avec le changement conformationnel de la Tyr^{355} qui permet, dans COX-2, une meilleure accessibilité à cette poche par un élargissement de 0,7 Å du segment hydrophobe. De plus, la substitution de la deuxième Ile^{434} en Val^{420} contribue à former une "porte moléculaire" qui agrandirait encore la nouvelle poche latérale, de sorte que le site actif de COX-2 aurait un volume supérieur de 25% à celui de COX-1 [Luong et coll, 1996].

I.A.4. Localisation cellulaire et distribution tissulaire

Les COXs sont toutes deux des enzymes membranaires monotopiques, présentes au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire. Récemment, il a été montré que les deux isoformes de COX existent en quantités égales au niveau des feuillets interne et externe de la membrane nucléaire de divers types cellulaires [Spencer et coll, 1998]. 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]. Par ailleurs, 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].
La distribution de COX-1 et de COX-2 est très différente entre les tissus (Tableau II). Elle peut varier selon les espèces [Feng et coll, 1993; O'Neill et Ford-Hutchinson, 1993; Seibert et coll, 1994], voire être hétérogène au sein d'un même tissu [Iseki, 1995; Yamagata et coll, 1993]. En effet, la COX-1 est présente dans la plupart des tissus, alors que COX-2 n'est exprimée constitutionnellement que dans très peu d'organes, bien que pouvant être induite dans un grand nombre de tissus en situation pathologique.

I.A.5. Activité enzymatique

Les isoformes de la cyclooxygénase sont des hémoprotéines bifonctionnelles qui catalysent la principale réaction commune à la biosynthèse des prostaglandines et conduisent, selon le contenu enzymatique cellulaire, à la production des différents dérivés. Elles assurent la transformation de l'AA en endoperoxyde PGG_2 grâce à leur activité dioxygénasique puis en PGH_2 par leur activité peroxydasique [Smith et coll, 1996; Smith et Marnett, 1991]. Ces deux activités enzymatiques sont assurées par des sites distincts mais proches. En effet, l'activité cyclooxygénasique peut être détruite

sans que l'activité peroxydasique ne soit affectée [Kulmacz et coll, 1994]. En revanche, la fonction peroxydasique est indispensable à l'initiation de l'activité cyclooxygénase. En effet, le groupement héminique du site actif peroxydasique doit être oxydé par un hydroperoxyde initiateur pour pouvoir à son tour oxyder une tyrosine (Tyr^{385}) voisine dans l'espace mais localisée sur le site actif cyclooxygénasique.

Tableau II : Localisation tissulaire des isoformes de COX de différentes espèces de mammifères [d'après Nédélec, 2000]

Isoforme	**Organe/Tissu**	**Cellules**
COX-1	cerveau, SN périph.	neurones
	muscle squelettique	
	poumon	cellules épithéliales
	rein	artérioles, glomérules, tube collecteur
	estomac	cellules à mucus profondes
	petit intestin	
	pancréas	îlots de Langerhans
	sang	plaquettes, monocytes, macrophages
	ovaires	
	utérus	endomètre
	placenta	
	prostate	
COX-2		
constitutionnelle	cerveau	neurones du cortex, hippocampe, amygdale
	poumon	cellules épithéliales
	rein	macula densa, cellules interstitielles de la médula
	estomac	cellules à mucus de surface
	petit intestin	
	ovaires	follicules avant ovulation
	utérus	
	placenta	épithélium amniotique
	prostate	
induite	sang	macrophages, lymphocytes, monocytes, neutrophiles
	os	ostéoblastes
	cartilage	chondrocytes articulaires
	synoviale	synoviocytes
	foie	cellules de Kupffer, hépatocytes
	vaisseau sanguin	cellules musculaires lisses
	cerveau	endothélium cérébral, cellules microgliales, neurones de l'hippocampe, cortex cérébral
	pancréas	îlots de Langerhans

Le radical tyrosyl ainsi formé est l'initiateur de l'oxygénation et permet l'extraction de l'hydrogène 13(S) de l'AA [Kulmacz, 1998] et forme ainsi un radical acyl gras ($Fe^{4+}Tyr/AA^{\bullet}$). Ce radical acyl gras réagit avec une molécule d'O_2 pour former le radical PGG2. Enfin, le PGG_2 est libéré et le radical tyrosyl régénéré. Cette première réaction de cyclooxygénation est suivie d'une peroxydation au cours de laquelle le groupement 15-hydroperoxy est transformé en 15-hydroxy, et le PGG_2 réduit en PGH_2.

Les peroxydes formés lors de la première étape de la réaction de cyclooxygénation peuvent être à l'origine de l'auto-inactivation des activités cyclooxygénasique et peroxydasique [Kulmacz, 1986].
Les deux isoformes de la cyclooxygénase ont des propriétés enzymatiques envers l'AA assez proches. En effet, elles possèdent des affinités (*K*m COX-1 = 2 µM, *K*m COX-2 = 2,7 µM) et des propriétés catalytiques (*V*max COX-1 = 30 µmol O_2/min/mg, *V*max COX-2 =43 µmol O_2/min/mg) similaires vis-à-vis de l'AA en PGH_2 [Percival et coll, 1994]. Cependant, leur sélectivité de substrat est légèrement différente : COX-2 métabolise des acides gras en C18 et C20:3 tandis que COX-1 n'utilise que l'AA (C20:4) comme substrat, ce qui peut être expliqué par la différence de largeur de leurs sites actifs [Meade et coll, 1993].

I.A.6. Fonction : de la synthèse des prostaglandines aux rôles physiopathologiques des COXs

Dans la voie des PGH synthétases, l'acide arachidonique est rapidement transformé en endoperoxydes instables, PGG_2 et PGH_2. La conversion enzymatique ultérieure des endoperoxydes en prostaglandines D_2, E_2, $F_{2\alpha}$, I_2 et en thromboxane A_2 s'effectue sous l'action d'isomérases ou de synthétases spécifiques, dont l'abondance, dépendante du tissu considéré, détermine le type de prostaglandines produites.

a) Phospholipases A_2 (PLA_2) et Prostaglandine synthétases

La libération de l'AA à partir des phospholipides membranaires se fait sous l'action des PLA_2 cytosoliques ($cPLA_2$) (groupe IVA) et sécrétoires ($sPLA_2$) (groupes IIA, IID, V et X). La PLA_2 impliquée dépend du type cellulaire et du stimulus. Il en existe cinq 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 PLA_2 sécrétées ($sPLA_2$). Le quatrième groupe ne comporte qu'une seule enzyme intracellulaire ou PLA_2 cytosolique ($cPLA_2$). 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 MAP (mitogen activating protein) kinases. Le cinquième groupe de PLA_2 comprend une enzyme intracytoplasmique, spécifique des phospholipides porteurs d'AA, mais ne requiert pas de calcium pour son activation [Kudo et Murakami, 2002].

b) Nomenclature des prostaglandines

Les prostanoïdes ont été découverts pour la première fois 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 actifs, 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 linolénique (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 étant chez l'homme, le précurseur le plus abondant, les PGs sont 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 poisson, 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 série 3, qui sont nettement moins inflammatoires que ceux issus de la biotransformation de l'AA [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 TxA_2).

L'AA libéré peut ensuite entrer dans deux voies de biosynthèse : celle catalysée par les COXs, permettant la production des prostaglandines, et celle catalysée par les lipoxygénases (LOXs) assurant la synthèse des leucotriènes et de dérivés hydroxylés.

Les prostaglandines sont réparties en trois séries, selon le nombre de doubles liaisons sur la chaîne latérale, dépendant de l'acide gras précurseur [Versteeg et coll, 1999] :

- série 1 : une seule double liaison Δ13 *trans* (20:4 ; 13)
- série 2 : deux doubles liaisons Δ5 *cis* et Δ13 *trans* (20:4 ; 5,13)
- série 3 : trois doubles liaisons Δ5 *cis*, Δ13 *trans* et Δ17 *trans* (20:4 ; 5,13,17)

Les prostaglandines sont classées en différentes catégories (Figure 5) :

- les endoperoxydes (PGG, PGH), intermédiaires instables caractérisés par la présence d'un pont peroxyde entre les carbones 9 et 11 du cyclopentane. Ils subissent rapidement des

modifications dépendantes de l'activité des isomérases cellulaires. Les PGH_2 peuvent être transformés en PGE_2 sous l'action d'une 9-kéto-isomérase, en $PGF_{2\alpha}$ par une réductase ou en PGD_2 sous l'action d'une 11-isomérase. Les PGH_2 peuvent également se transformer grâce à une thromboxane synthétase, en TxA_2, ou sous l'action d'une prostacycline synthétase, en PGI_2.

- les prostaglandines primaires, qui possèdent trois caractéristiques 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). Les PGs primaires sont réparties en différentes classes selon la nature des substituants du noyau cyclopentane et de son degré de saturation. Les PGs A, B et C possèdent une cétone en C9 et une double liaison dans le cycle cyclopentane. Par contre, les PGs D, E et F présentent un cycle cyclopentane saturé et différents groupes dans les positions 9 et 11 (alcool ou cétone). Les PGF sont dénommées α si elles sont d'origine naturelle, β pour les PGs de synthèse.
- les thromboxanes, dans lesquels le noyau cyclopentane du PGH_2 est transformé en cycle tétrahydropyrane sous l'action d'une thromboxane synthétase pour former le TxA_2, rapidement hydrolysé en un dérivé stable mais inactif, le TxB_2 [Despré et coll, 1989].
- la prostacycline et ses dérivés, caractérisée par la présence d'un cycle tétrahydrofurane accolé au noyau cyclopentane. Synthétisée à partir de l'endoperoxyde PGH_2 sous l'action d'une prostacycline synthétase, elle est rapidement hydrolysée en un métabolite stable, le 6-kéto $PGF_{1\alpha}$.

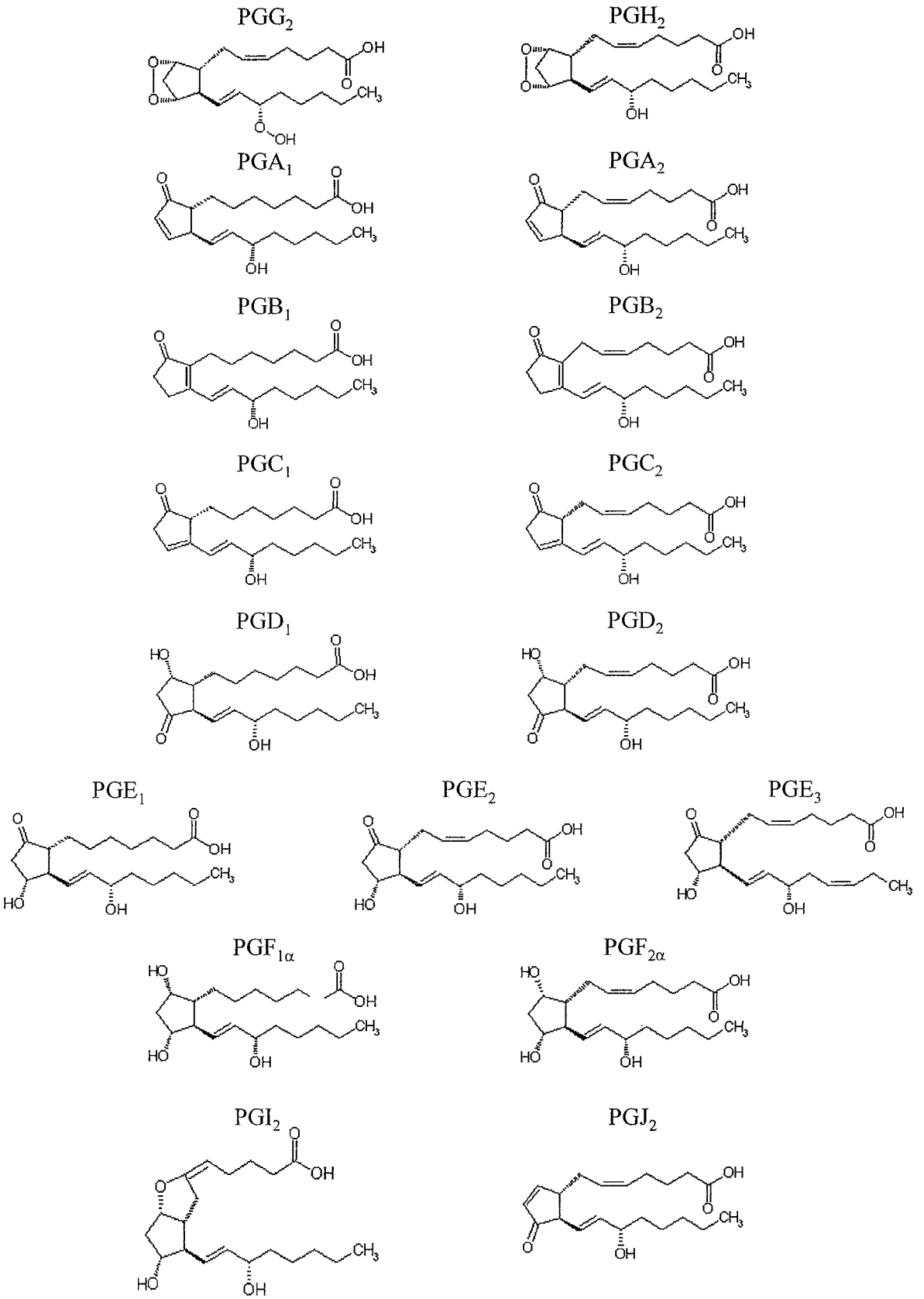


Figure 5 : Structure chimique des prostaglandines primaires

c) 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 cellules dont elles sont issues (action autocrine) en tant que premiers messagers.

Ces récepteurs appartiennent à deux types de superfamille de récepteurs :

- les récepteurs membranaires couplés à la protéine G
- les récepteurs nucléaires aux hormones ou aux stéroïdes [Versteeg et coll, 1999].

Les récepteurs membranaires

Les différentes PGs et les thromboxanes sont impliqués dans 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 EP_1 dans les fibroblastes, les récepteurs EP_2 et EP_4 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, EP_2, EP_4 et DP [Adie et coll, 1992; Ichikawa et coll, 1996; Reimer et coll, 1992] 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, EP_1 et FP [Funk et coll, 1993; Mayeux et coll, 1989; Watabe et coll, 1993; Watanabe et coll, 1994] et conduit à la mobilisation du Ca^{2+} par la protéine G_q et à l'utilisation du phosphatidylinositol. Le type de récepteur TP peut également activer les protéines G_{i1}, G_{i2} et G_{i3} et une forme non-identifiée de 85-kDa [Knezevic et coll, 1993; Offermanns et coll, 1994; Ushikubi et coll, 1994], 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 EP_3 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 $EP_{3\alpha, \beta}$ 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 G_0 [Namba et coll,

1993]. Ceci conduit à l'inhibition de la protéine G_0 en augmentant son affinité pour le facteur de dissociation du GTP [Negishi et coll, 1993]. Les effets des différents récepteurs EP_3 montrent une certaine spécificité d'espèce.

Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs activés par les prolifférateurs de peroxysomes (PPARs), membres de la famille des récepteurs nucléaires, sont des facteurs de transcription activés par de nombreux ligands. Ils agissent sous forme d'un hétérodimère avec le récepteur des rétinoïdes [Kliewer et coll, 1992] qui se fixe à l'ADN sur des séquences spécifiques (éléments de réponse aux prolifférateurs de peroxysomes), conduisant ainsi à l'activation d'un gène cible. Les PPARs comprennent 3 isoformes α, β et γ. Elles diffèrent notamment par leur spécificité d'expression [Braissant et coll, 1996]. Le PPARα est exprimé de façon prédominante dans les organes ayant une forte activité catabolique lipidique comme le cœur, le foie ou les reins. L'expression du PPARβ est ubiquitaire et son rôle n'est pas clairement établi. Enfin, l'expression du PPARγ est prédominante dans les organes synthétisant ou stockant les lipides tels le tissu adipeux, la glande surrénale, la rate, le gros intestin et les cellules du système immunitaire [Chawla et coll, 1994; Fajas et coll, 1997; Kliewer et coll, 1997; Tontonoz et coll, 1994]. Les PPARs ont en commun la capacité d'être stimulés par une large variété de substances lipidiques sans affinité marquée, ils fixent ainsi les acides gras. Toutefois, des substrats préférentiels existent pour chaque isoforme. Ainsi, PPARγ est activé spécifiquement par la 15-$\Delta^{12\text{-}14}$ prostaglandine J_2 (15d-PGJ_2), un métabolite du PGG_2 [Tontonoz et coll, 1994], ce qui expliquerait en partie l'action anti-inflammatoire de la 15d-PGJ_2. En effet, PPARγ est un facteur important de l'immunomodulation, de la cancérisation et du métabolisme des lipides [Vamecq et Latruffe, 1999]. De plus, PPARγ, activé par la 15d-PGJ_2, peut se fixer à NF-κB, ce qui conduit à l'inactivation de ce facteur de transcription pro-inflammatoire [Ricote et coll, 1998]. L'activation de PPARγ conduit à la régulation négative de l'expression de gènes pro-inflammatoires, et à l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses [Elstner et coll, 1998; Kubota et coll, 1998; Ricote et coll, 1998]. De plus, les agonistes du PPARγ peuvent inhiber la production des cytokines inflammatoires par les monocytes et l'expression de la iNOS [Jiang et coll, 1998]. PPARα possède également des effets anti-inflammatoires [Devchand et coll, 1996]. PPARα limite l'action du LTB_4 par stimulation de gènes impliqués dans la dégradation de ce dernier, notamment lorsque PPARα est activé par le LTB_4 lui-même.

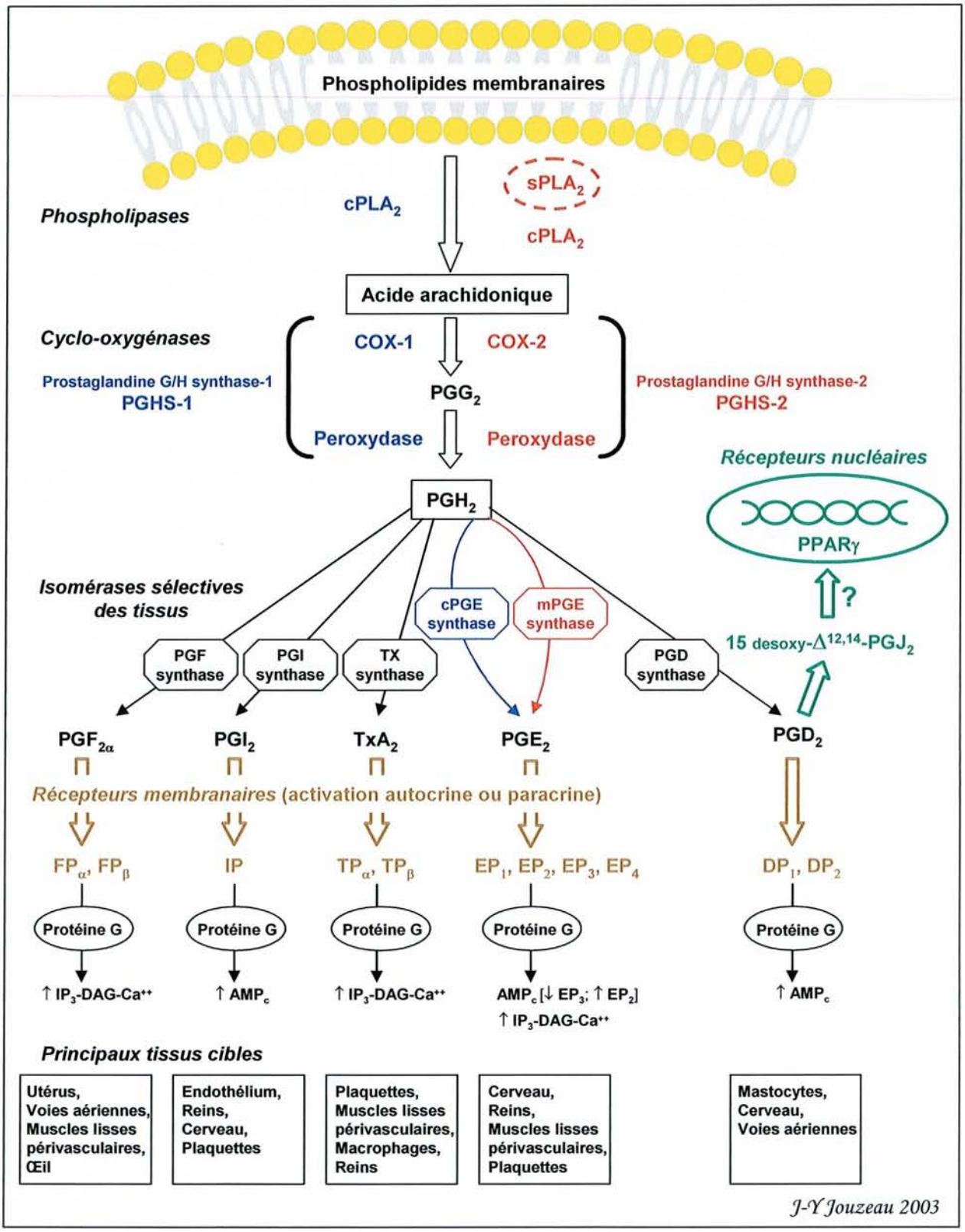


Figure 6 : Biosynthèse et transduction du signal des prostaglandines

I.A.7. Effets biologiques des prostaglandines

En raison de leur synthèse ubiquitaire et de la multiplicité de leurs effets biologiques, souvent contradictoires, les PG sont impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques. Outre les variations de réponses biologiques dues aux spécificités d'espèce, les différentes prostaglandines peuvent avoir des effets opposés sur un même organe, et une prostaglandine donnée peut même exercer des effets opposés selon la partie de l'organe considéré (par exemple, PGE_2 contracte le corps utérin en même temps qu'elle dilate le col de l'utérus). De plus, des effets inverses peuvent parfois être observés selon la concentration du composé. En effet, à faible concentration (<1µM), la PGE_2 potentialise l'action pro-agrégante de divers stimuli alors qu'à plus forte concentration, elle l'inhibe. Enfin, deux prostaglandines appartenant à la même classe mais différant par leur degré d'insaturation comme PGE_1 et PGE_2 peuvent exercer des actions opposées dans le même tissu (par exemple, PGE_1 à faible concentration inhibe l'agrégation plaquettaire contrairement à la PGE_2). Ces effets biologiques, parfois contradictoires, pourraient être expliqués par la diversité des récepteurs exprimés selon l'organe considéré, d'autant que les réponses médiées par les cinq types de récepteurs peuvent être de nature opposée.

a) Système cardiovasculaire

Les prostaglandines exercent peu d'influence directe sur la fonction cardiaque, mais elles agissent sur la musculature vasculaire lisse et montrent des actions myoconstrictrices ou myorelaxantes. Ainsi, PGE_2, E_1 D_2 I_2 ou A_2 sont vasodilatatrices tandis que le TxA_2 est vasoconstricteur [Eklund et Carlson, 1980]. Des analogues stables de PGE_1 sont employés en clinique lors d'une cardiopathie congénitale ductodépendante chez le nouveau-né (Prostine®) ou dans le traitement des troubles de l'érection chez l'homme (Caverject®).

b) Hémostase

Les prostaglandines jouent un rôle essentiel dans l'hémostase grâce à l'équilibre entre la production de TxA_2 et celle de PGI_2. Le TxA_2, synthétisé de façon exclusive par les plaquettes, est vasoconstricteur et est un agrégant plaquettaire puissant. A l'inverse, la PGI_2 produite abondamment par les cellules endothéliales vasculaires est vasodilatatrice et anti-agrégante. Il existe donc un équilibre entre les plaquettes prédisposées à s'agréger et les cellules endothéliales vasculaires qui s'opposent physiologiquement à cette agrégation. Cette dualité d'effets est d'ailleurs mise à profit en cardiologie, où l'on prévient certaines complications thrombotiques par l'administration de faibles posologies d'aspirine susceptibles de bloquer plus efficacement la synthèse de TxA_2 par les plaquettes que celle de PGI_2 par l'endothélium [O'Grady et Moncada, 1978]. Cet effet relève

également du caractère irréversible de l'inhibition des COXs par l'aspirine, qui a des conséquences fonctionnelles plus durables sur la plaquette dont les activités enzymatiques ne sont pas renouvelables (absence de noyau). Par ailleurs, un analogue synthétique de la prostacycline, l'iloprost (Ilomédine®) est utilisé en clinique pour le traitement de l'ischémie chronique sévère des membres inférieurs.

c) Système respiratoire

Le poumon est connu pour être l'un des sites majeurs à la fois de la biosynthèse et de l'inactivation métabolique des prostaglandines. Leurs rôles physiopathologiques dans le système respiratoire sont à la fois de nature vasculaire et métabolique. Elles exercent une action directe sur la musculature lisse bronchique. $PGF_{2\alpha}$ et surtout les endoperoxydes et le TxA_2, ont une puissante action bronchoconstrictrice. Une libération de $PGF_{2\alpha}$ a été mise en évidence lors de crises d'asthme provoquées par des allergènes. De plus $PGF_{2\alpha}$ a une action vasoconstrictrice, ce qui conduit à envisager son rôle étio-pathogénique dans l'asthme. Toutefois, certains travaux semblent privilégier le rôle des leucotriènes. A l'inverse, les PGE, et essentiellement PGE_1, ont non seulement une action hypotensive sur la pression pulmonaire, mais sont broncho-dilatatrices. Cependant, leur utilisation thérapeutique a été limitée en raison de leurs effets indésirables (initiation et inflammation trachéale) lors de leur administration en aérosol [Spannhake et coll, 1981]. En revanche, un analogue synthétique de la PGE_2, l'époprosténol (Flolan®) est utilisé par voie parentérale pour le traitement au long cours de l'hypertension artérielle pulmonaire primitive sévère.

d) Prostaglandines et fonction rénale

Le cortex rénal est principalement impliqué dans la biosynthèse de la PGI_2 ainsi que dans le métabolisme des prostaglandines. La médula produit une quantité beaucoup plus importante de prostaglandines, la plus abondante étant la PGE_2. Ainsi, par leurs actions myorelaxantes, PGE_2, E_1 et I_2 exercent un effet vasodilatateur puissant consécutif à leur fixation aux récepteurs EP_2. Cette vasodilatation permet de maintenir la pression de filtration au niveau du glomérule, notamment en cas d'hypoperfusion rénale (hypovolémie, sténose de l'artère rénale). Cet effet vasodilatateur s'accompagne d'une augmentation de l'excrétion de l'eau et des électrolytes et de la libération d'hormones telle que la rénine [Fisher, 1980].

e) Prostaglandines et système reproducteur

Bien que les prostaglandines existent à une concentration élevée dans le liquide séminal, abondance à l'origine de leur découverte, on ignore encore leur rôle physiologique exact chez l'homme. En

revanche, elles sont impliquées dans pratiquement toutes les phases de l'activité génitale chez la femme. Les prostaglandines et surtout les PGE_2 et $F_{2\alpha}$ interviennent dans le déroulement de l'ovulation, la menstruation, la lutéolyse, contrôlent le transport de l'ovule vers l'utérus et stimulent la musculature utérine, ce qui leur confère des propriétés ocytociques. Ces propriétés sont mises à profit en obstétrique, soit pour déclencher le travail à terme par administration d'un analogue synthétique de PGE_2 à faible concentration, la dinoprostone (Prostine®, Prepidil®), soit dans le cadre de l'interruption volontaire de grossesse par injection de dinoprostone à forte concentration (Prostine®) ou application locale de généprost, analogue synthétique de PGE_1 (Cervageme®).

Les prostaglandines jouent également un rôle important dans certaines fonctions métaboliques ou endocriniennes comme la lipolyse, la sécrétion d'insuline ou le remodelage osseux (activité ostéoclastique) et, bien évidemment, dans les mécanismes de la réaction inflammatoire.

f) Prostaglandines et inflammation

Les prostaglandines contribuent à la genèse des signes et des symptômes de l'inflammation, où elles agiraient comme modulateur plutôt que comme médiateur. Leurs propriétés pro-inflammatoires peuvent être divisées en trois classes.

Signes cardinaux de l'inflammation

La rougeur du tissu lésé (*rubor*) est due, en partie, à l'action vasodilatatrice des prostaglandines (PGE_2, PGI_2, PGD_2) au niveau des artérioles et des veinules. L'œdème (*tumor*) qui apparaît simultanément résulte de l'action synergique des prostaglandines et d'agents vasoactifs comme la sérotonine, les kinines et la substance P qui augmentent la perméabilité vasculaire. De plus, la chaleur (*calor*) locale pourrait relever majoritairement de l'afflux sanguin et donc de l'effet vasodilatateur des prostaglandines [Belch, 1989]. La douleur (*dolor*) perçue lors d'une inflammation périphérique est également dépendante des prostaglandines. Ces dernières, bien qu'étant peu algogènes, jouent un rôle essentiel dans la perception de la douleur et potentialisent la sensation douloureuse puisqu'elles abaissent le seuil d'excitabilité des nocicepteurs périphériques aux substances algogènes endogènes (substance P, histamine ou bradykinine par exemple). Au niveau central, les prostaglandines peuvent également potentialiser la transmission de l'information nociceptive. Elles n'interviennent pas dans la transmission de la douleur aiguë, mais agissent lors de la douleur persistante notamment due à une inflammation périphérique. En effet, sous l'action de stimuli répétés, des prostaglandines sont libérées par les neurones post-synaptiques, puis en se fixant sur leurs récepteurs au niveau des neurones pré-synaptiques, elles facilitent la libération des

neurotransmetteurs par ces derniers [Yaksh, 1999]. Cependant, $PGF_{2\alpha}$ peut diminuer l'effet hyperalgésique de PGE_2 et l'action antalgique de la β-endorphine pourrait s'expliquer, en partie, par l'inhibition qu'elle exerce sur la biosynthèse des prostaglandines.

Action sur les polynucléaires neutrophiles

Certaines prostaglandines comme PGI_2, PGE_1 et PGE_2 induisent une augmentation de l'AMPc intracellulaire dans les polynucléaires, ce qui a pour effet de diminuer la libération des enzymes lysosomales et de réduire le chimiotactisme et la diapédèse. Au contraire, la $PGF_{2\alpha}$ induirait une augmentation du chimiotactisme en augmentant le taux de GMPc.

Action sur les lymphocytes

Comme pour les polynucléaires neutrophiles, les PGE_1, E_2 et I_2 ont un effet inhibiteur sur les fonctions lymphocytaires. En effet, une addition de PGE_2 ou de PGI_2 inhibe la fonction lymphocytaire *in vitro* en augmentant le taux d'AMPc intracellulaire. Ces molécules inhibent également *in vivo* les réponses médiées par les lymphocytes. A l'inverse, une addition de $PGF_{2\alpha}$ active expérimentalement la prolifération des lymphocytes grâce à une augmentation du GMPc intracellulaire. Des résultats discordants ont cependant été rapportés sur la production d'immunoglobulines et la fonction lymphocytaire T-suppressive [Belch, 1989].

g) Prostaglandines et système gastro-intestinal

Les prostaglandines ont été identifiées, à des concentrations variables, dans tous les segments du tractus digestif mais c'est l'estomac, et particulièrement la région antrale, qui possède la plus forte capacité de biosynthèse [Eberhart et Dubois, 1995]. Les prostaglandines sont impliquées dans la motricité digestive. En effet, par leur action myorelaxante, les PGE_1, E_2, et I_2 diminuent la pression du sphincter antérieur de l'œsophage et inhibent les contractions antrales spontanées ou provoquées, contrairement à la $PGF_{2\alpha}$ qui induit la contraction des muscles sphinctériens et stomacaux. Elles jouent également un rôle très important dans les sécrétions digestives et la cytoprotection des muqueuses. D'une part, au niveau gastrique, elles stimulent la production du mucus et la sécrétion hydrocarbonatée qui auront pour effet de limiter la rétrodiffusion des ions H^+ vers les cellules pariétales. D'autre part, en maintenant le flux sanguin sous-muqueux, elles entretiennent une activité métabolique importante et nécessaire au renouvellement des cellules de la paroi digestive. Enfin, en augmentant le taux d'AMPc dans les cellules pariétales gastriques, elles réduisent la sécrétion acide gastrique induite par la gastrine ou l'histamine [Johansson et Bergstrom, 1982; Wilson et Kaymakcalan, 1981].

En thérapeutique, des analogues synthétiques de la PGE_1 comme le misoprostol (Cytotec®) sont utilisés dans la prévention et le traitement des lésions gastro-duodénales induites par les AINS et la prévention de leurs complications graves [Graham et coll, 1988].

h) Prostaglandines et cartilage

La contribution des prostaglandines dans l'homéostasie du cartilage est peu connue et semble surtout ambiguë. En effet, certains travaux expérimentaux montrent que les prostaglandines inhibent la synthèse des kératanes sulfates [Fukuda et coll, 1995], des agrécanes [Fulkerson et Damiano, 1983; Mitrovic et coll, 1981] et des collagènes [O'Keefe et coll, 1992]. Elles moduleraient également l'équilibre entre les protéinases et leurs inhibiteurs [Yamada et coll, 1996] et réduiraient la prolifération chondrocytaire [Blanco et Lotz, 1995], ce qui pourrait conduire à des effets délétères sur le cartilage. A l'inverse, d'autres expériences montrent qu'elles diminueraient la dégradation des constituants matriciels du cartilage, en inhibant l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMP) [Steinberg et Sledge, 1991], et qu'elles pourraient stimuler la prolifération chondrocytaire, la synthèse des protéoglycanes et des collagènes [Di Battista et coll, 1996], ce qui leur conféreraient des propriétés bénéfiques sur le cartilage.

I.B. CLASSIFICATION CHIMIQUE DES AINS

Cette classification a été longtemps utilisée pour distinguer les différents groupes chimiques de cette famille hétérogène. Il est possible de définir :

Les AINS à caractère acide, comprenant les AINS les plus anciennement connus (Figure 7) :

- Acides arylcarboxyliques
  - acides salicyliques et dérivés
    - acide salicylique, salicylamide, sulfasalazine, mesalazine
    - acide acétylsalicylique, diflunisal, bénorilate
  - acides acétiques
    - acides phénylacétiques et apparentés (diclofénac, étodolac, nabumétone)
    - acides indolacétiques et apparentés (indométacine, sulindac)
  - acides arylpropioniques et dérivés : ibuprofène, flurbiprofène, kétoprofène, naproxène, fénoprofène, alminoprofène, fenbufène, acide tiaprofènique
  - acides anthraniliques ou fénamates (acide niflumique, acide méfénamique)
- Acides énoliques
  - pyrazolones (phénylbutazone)
  - carboxamides du benzothiazine-dioxyde (oxicams) : piroxicam, ténoxicam, méloxicam

Acide salicyliques et dérivés

Ancêtre de l'ensemble des AINS, l'aspirine ou acide 2-(acétyloxy)benzoïque est la molécule type de cette classe chimique. Elle exerce des effets pharmacologiques différents selon la posologie administrée : anti-agrégant plaquettaire à faible dose (75 à 325 mg/j chez l'adulte), antalgique et antipyrétique à dose moyenne (0,5 à 2 g/j) et anti-inflammatoire à forte dose (3 à 6 g/j). La faible demi-vie de l'aspirine ($t_{1/2}$ = 15 à 30 min) est due à l'abondance d'estérases dans la circulation générale qui la désacétylent très rapidement (Tableau III). L'acide salicylique ainsi généré, a une élimination beaucoup plus lente ($t_{1/2}$ = plusieurs heures) non proportionnelle à la quantité de métabolite formé.

Acides phénylacétiques et apparentés

Ce groupe comprend le diclofénac ou acide 2-[(2,6-dichlorophényl)amino]benzène, l'étodolac, le fenclofénac et un dérivé pyrrolé de l'acide acétique, la tolmédine. On pourrait rapprocher de ce groupe les dérivés de l'acide naphtylacétique comme la nabumétone qui est un promédicament car il est biotransformé en métabolite actif, l'acide 6-méthoxy-2-napthylacétique (6-MNA).

Acides indolacétiques et dérivés

Le chef de file de ce groupe, l'acide 1-[p-chlorobenzoyl]-5-méthoxy-2-méthylindol-3-acétique ou indométacine est un puissant anti-inflammatoire souvent considéré comme référence dans ce domaine (Tableau III). Elle exerce des effets anti-inflammatoires et antalgiques aux mêmes doses et possède également une action antipyrétique et anti-agrégante plaquettaire. Mais en raison de la fréquence relativement élevée d'effets indésirables digestifs ou neuro-psychiques, son usage est réservé au traitement symptomatique des rhumatismes inflammatoires sévères.

Le sulindac (acide (Z)-5-fluoro-2-méthyl-1-[p-(méthylsulfinyl)benzylidène]-1*H*-indène-3-acétique) est un pro-médicament (Tableau III). Il est métabolisé au niveau du foie en dérivé sulfure, de manière réversible, par une réductase dépendante du NADPH, et en sulfone, de manière irréversible par une une sulfide-oxydase microsomale [Shen et Winter, 1977; Tatsumi et coll, 1983]. Seul le dérivé sulfure est doué de propriétés antalgique, antipyrétique et anti-inflammatoire. Le sulindac, le sulfure et la sulfone subissent une excrétion biliaire avec cycle entérohépatique, mais ce phénomène est très limité quantitativement pour le sulfure alors qu'il est important pour le sulindac, la clairance biliaire étant estimée comme 25 fois plus grande que pour le sulfure, de sorte qu'il existe essentiellement une recirculation de la pro-drogue inactive, ce qui contribue à limiter la toxicité digestive haute de cet AINS. Il est suggéré que la réduction du sulfoxide (sulindac) en sulfure pourrait être favorisée par la flore bactérienne colique, ce qui contribuerait aux concentrations

locales élevées pouvant être mesurées à ce niveau [Davies et Watson, 1997; Duggan et coll, 1980; Duggan et coll, 1978].

Acides propioniques et dérivés

La majorité des molécules de ce groupe dérive de l'acide phényl-2-propionique et sont rassemblées sous le vocable de profénides. Ce groupe est, en nombre de molécules commercialisées, le plus important des AINS. L'ibuprofène ou acide (±)-α-méthyl-4-(2-méthylpropyl)benzène acétique pourrait être sa molécule type.

Une première particularité de cette classe est l'existence d'un centre d'asymétrie dans les molécules, qui sont donc présentes sous la forme de deux énantiomères (R) et (S). Tous les dérivés propioniques, à l'exception du naproxène ou de l'acide 6-méthoxy-α-méthyl-2-naphtalène acétique (énantiomère S uniquement), sont commercialisés sous la forme d'un mélange racémique. La configuration absolue S des AINS semblant la plus active en tant qu'inhibiteur enzymatique et anti-inflammatoire, les énantiomères pourraient jouer un rôle différent dans les propriétés anti-inflammatoires et antalgiques ainsi que dans la survenue de certains effets indésirables.

La deuxième particularité de ce groupe est la franche variation des effets pharmacologiques selon la dose administrée, puisque l'effet anti-inflammatoire nécessite une posologie au moins double de celle requise pour un effet antalgique ou antipyrétique. Cette dose-dépendance est à l'origine de la commercialisation de l'ibuprofène et du kétoprofène (Tableau III) sous plusieurs formes thérapeutiques, soit faiblement dosées à visée antalgique soit plus fortement dosées à visée anti-inflammatoire.

Le fenbufène peut être considéré comme un pro-médicament car il n'acquière ses propriétés anti-inflammatoires qu'après métabolisation hépatique progressive en acide biphénylacétique (BPAA).

Les dérivés des acides (benzoyl-thiényl) alcanoïque ou (diphényl-oxazol) alcanoïque comme l'acide tiaprofénique et l'oxaprozine, respectivement, ne font pas partie *stricto sensu* du groupe des phénylpropioniques.

Acides anthraniliques et dérivés

Ce groupe comprend les fénamates et également deux dérivés de l'acide nicotinique, l'acide niflumique et la flumixine, son dérivé méthylé. Les fénamates sont essentiellement utilisés pour leurs effets antalgiques et anti-inflammatoires. En plus des effets indésirables classiques des AINS, les molécules trifluorées (acide flufénamique, acide niflumique et flumixine) exposent au risque de fluorose osseuse lors de traitements prolongés.

Pyrazolones

Le chef de file de ce groupe est la phénylbutazone ou 4-butyl-1,2-diphényl-3,5-pyrazolidinedione. C'est un anti-inflammatoire très puissant qui possède, à un degré moindre, des propriétés antalgique, antipyrétique et anti-agrégante plaquettaire. Elle est métabolisée au niveau du foie en plusieurs dérivées hydroxylés dont l'un, la γ-hydroxyphénylbutazone, est actif et fut commercialisé sous le nom d'oxyphenbutazone. Ces deux molécules se distinguent, des autres AINS, par une demi-vie très longue (≥ 75 heures chez l'homme) et par la fréquence ou la gravité de leurs effets indésirables hématologiques (agranulocytose) ou cutanés (syndrome de Lyell). Ces effets indésirables ont été à l'origine du retrait du marché de l'oxyphenbutazone et de la limitation d'emploi de la phénylbutazone.

Carboxamides du thiazine-dioxyde (Oxicams)

Ce groupe comprend des dérivés du benzothiazine-dioxyde comme le piroxicam et des dérivés du thiénothiazine-dioxyde comme le ténoxicam. Ce sont des composés à durée de vie longue (50 à 70 heures chez l'homme). Le méloxicam se distingue par sa demi-vie plus courte (20 heures) et par une préférentialité d'inhibition pour l'une des isoformes de la cyclooxygénase.

I.C. MECANISMES D'INHIBITION DES CYCLO-OXYGENASES PAR LES AINS

▫ **Inhibition irréversible des cyclo-oxygénases**. Ce mécanisme ne concerne qu'une seule molécule commercialisée : l'aspirine. Des études récentes ont montré que l'action de l'acide acétylsalicylique est identique sur les deux isoenzymes de COX, mais que ses conséquences sont différentes. Ainsi, la COX-1 est acétylée de façon covalente sur la Ser^{529} sur l'enzyme humaine, située au voisinage du site actif (Tyr^{385}), ce qui bloque irréversiblement l'activité dioxygénasique par encombrement stérique. La COX-2 est également acétylée sur la Ser^{516} chez toutes les espèces, mais le blocage du site actif dioxygénasique n'est que partiel, en raison d'un canal hydrophobe plus large que celui de la COX-1. Dans ce cas, il y a alors déviation des voies de biotransformation de l'acide arachidonique vers la formation de l'acide 15-hydroxyéicosatétraènoïque (15*R*-HETE), qui peut lui-même être biotransformé en épilipoxines par la lipoxygénase.

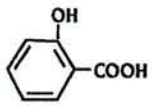
▫ **Inhibition réversible des cyclo-oxygénases**. Mécanisme d'action commun à la plupart des AINS, on peut cependant distinguer :

· Des inhibiteurs compétitifs (kétoprofène par exemple) entrant en compétition avec l'acide arachidonique, et formant un complexe enzyme-inhibiteur rapidement dissociable. Leur action sur les deux isoenzymes est indépendante du temps.

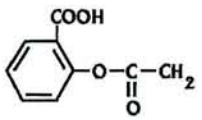
· Des inhibiteurs d'interaction lente ou "slow tight-binding inhibitor" (indométacine par exemple), dont l'action sur les cyclo-oxygénases dépend du temps. Ils forment avec l'enzyme un complexe intermédiaire rapidement dissociable qui évolue secondairement vers un complexe lentement dissociable.

Des études récentes ont montré que le type d'inhibition de la cyclo-oxygénase par un AINS peut être différent selon l'isoforme considérée, ce qui pourrait expliquer la "sélectivité" de certaines molécules pour une isoenzyme [Terlain et coll, 1996].

Acides salicyliques

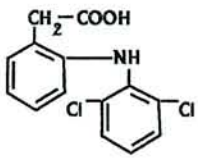


Acide salicylique

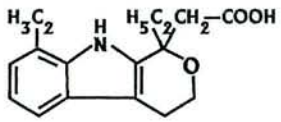


Aspirine

Acides phénylacétiques

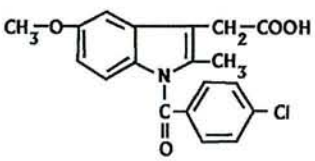


Diclofénac

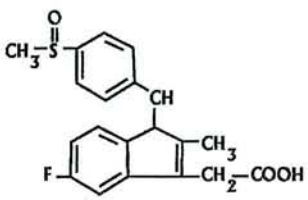


Etodolac

Acides indolacétiques

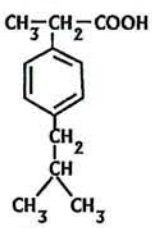


Indométacine

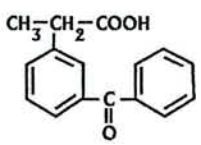


Sulindac

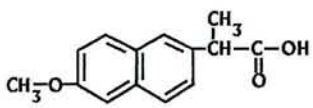
Acides propioniques



Ibuprofène

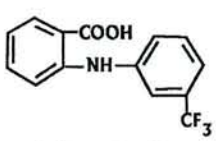


Kétoprofène

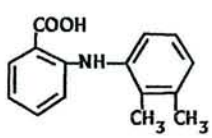


Naproxène

Acides anthraniliques

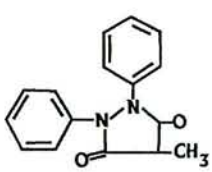


Acide niflumique



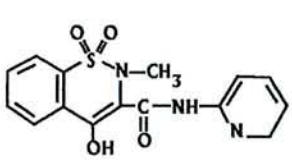
Acide méfénamique

Pyrazolones

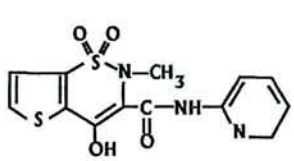


Phénylbutazone

Oxicams



Piroxicam



Ténoxicam

Méloxicam

Figure 7 : Structure chimique et classification de quelques AINS

I.D. NOUVELLE CLASSIFICATION DES AINS SELON LEUR SELECTIVITE D'INHIBITION DES ISOENZYMES DE LA COX

La théorie des COXs, a généré un effort intensif de la part de l'industrie pharmaceutique, pour trouver des molécules susceptibles d'inhiber COX-2, sans inhiber COX-1. Ainsi, de nombreuses méthodes biologiques (enzymes purifiées, lignées cellulaires, etc.) ont été développées pour le criblage des médicaments, sur le principe de la comparaison du pouvoir inhibiteur des molécules sur des systèmes simplifiés exprimant majoritairement et/ou exclusivement COX-1 ou COX-2 [Pairet, 1998]. L'ensemble de ces travaux a permis de définir la notion de sélectivité des AINS, exprimée initialement sous la forme du rapport des valeurs de CI_{50} [concentration inhibant l'activité enzymatique de 50%] vis à vis de COX-2 et de COX-1 (sélectivité pour COX-2 traduite par un rapport élevé si indice $CI_{50COX-1}$/ $CI_{50COX-2}$ ou un rapport faible si indice $CI_{50COX-2}$/ $CI_{50COX-1}$). La première conséquence a été l'établissement d'une nouvelle classification des AINS, selon leur sélectivité d'inhibition des isoenzymes de la COX et non selon leur structure chimique [Frölich, 1997]. La prise en considération du pouvoir inhibiteur des molécules sur les tissus cibles (articulation inflammatoire, muqueuse gastrique, etc.) dans les modèles animaux [Futaki et coll, 1993], et du niveau d'inhibition des isoenzymes sanguines (COX-1 plaquettaire, COX-2 leucocytaire) après prise orale du médicament chez l'Homme [Panara et coll, 1998], est venue compléter la définition de la sélectivité des AINS pour les COXs [Lipsky et coll, 1998].

Sur la base de ces critères de sélectivité, on distingue désormais 3 catégories d'AINS :

- *les inhibiteurs non sélectifs des COXs* (la majorité des AINS classiques) qui inhibent à la fois COX-1 et COX-2 aux posologies recommandées, à l'exception des posologies anti-thrombotiques d'aspirine (inhibition sélective ou préférentielle de COX-1 selon la posologie);
- *les inhibiteurs préférentiels de COX-2* (comme le méloxicam MOBIC®, le nimésulide NEXEN® et peut-être l'étodolac LODINE®) dont la sélectivité d'inhibition sur COX-2 n'apparaît qu'aux posologies minimales recommandées;
- *les inhibiteurs sélectifs de COX-2* (comme le célécoxib CELEBREX® et le rofécoxib VIOXX®), parfois dénommés « inhibiteurs spécifiques de COX-2 » ou « anti-COX-2 » par abus de langage ou anglicisme, qui n'inhibent pas significativement COX-1 aux posologies maximales recommandées.

Il est important de souligner l'intérêt des études cliniques, qui seules permettent d'établir la sélectivité aux posologies répondant à des critères d'efficacité et en tenant compte des propriétés pharmacocinétiques des produits [Lipsky et coll, 1998]. Toutefois, on dispose principalement d'une

sélectivité clinique vis à vis des COXs sanguines, ce qui est pertinent par rapport aux enzymes tissulaires (pouvoir inhibiteur comparable d'un AINS sur la COX-1 plaquettaire et sur une biopsie gastrique [Cryer et Feldman, 1998]) mais ne rend pas compte des différences de concentrations pouvant exister entre le compartiment central et les tissus. L'absence d'inhibition de la biosynthèse gastrique de PGE_2 vient cependant d'être confirmée chez l'homme après prise orale d'un inhibiteur sélectif de COX-2 à posologie thérapeutique [Wight et coll, 2001].

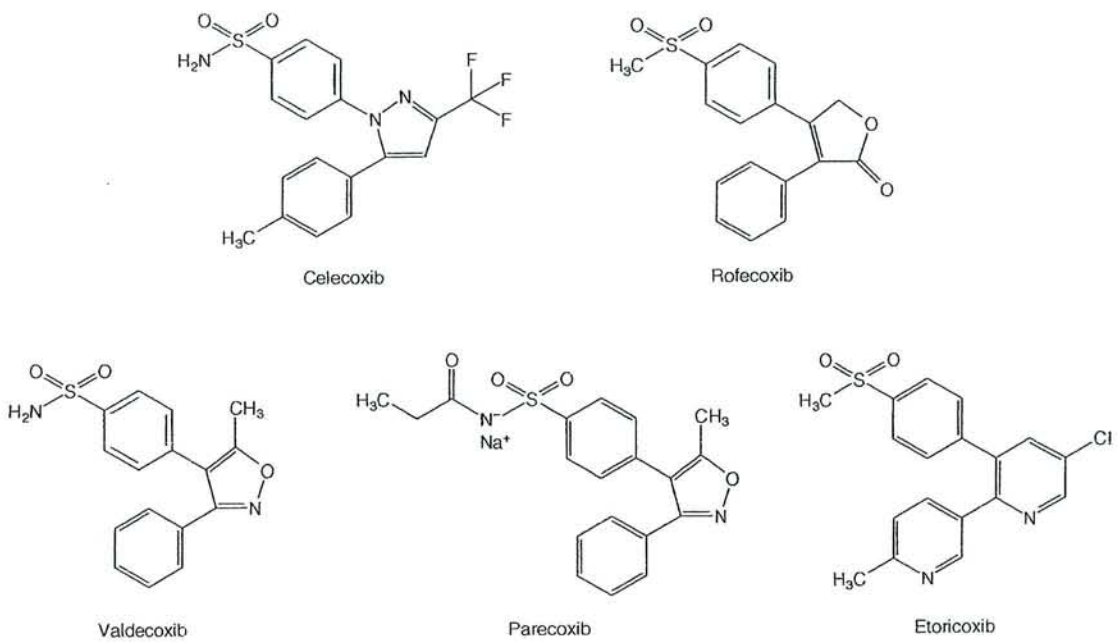


Figure 8 : Structure chimique des inhibiteurs sélectifs de COX-2

I.E. LES INHIBITEURS SELECTIFS DE LA COX-2

La découverte de la COX-2 et de ses fonctions potentielles a permis d'envisager qu'une inhibition sélective ce cette isoenzyme supporterait les effets analgésiques et anti-inflammatoires des AINS tout en épargnant la COX-1 et son rôle physiologique, notamment aux niveaux gastrointestinal et rénal. La recherche s'est donc tournée vers le développement de molécules hautement sélectives de la COX-2. Les principaux composés sont des dérivés :

Les inhibiteurs de COX-2 peuvent être classés selon leurs différences structurales (Figure 8) :

1. les éthers diaryl- et aryl-hétéroaryles (les inhibiteurs sulfonanilides) : 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)

I.E.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 méthanesulfonilanilide [Davis et Brogden, 1994; Huff et coll, 1995; Patrignani et coll, 1994]. La structure sulfonamide avec sa fonction acide NH, semble être indispensable.

I.E.2. Les hétérocycles diaryles

Les composés de cette classe comportent un cycle central carbocyclique ou hétérocyclique supporté par deux entités aryles vicinales. 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 sufolnamide 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, et possède une indication comme médicament orphelin dans la polypose familiale. *In vitro* il est capable d'inhiber sélectivement COX-2 (CI_{50} COX-1=13 µmol, CI_{50} COX-2=0,04 µmol). 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]. Utilisé à 400 mg/j, le célécoxib a des propriétés analgésiques et anti-phlogistiques, équivalentes à 1000 mg de naproxène ou à 150 mg de diclofénac (Tableau III). 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 du 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 [Ehrich et coll, 1999]. Cette molécule a été récemment retirée du marché au niveau mondial, en raison d'une augmentation des cas d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux [Topol, 2004]. Ce retrait soulève à nouveau la question du risque cardiovasculaire des coxibs [Fitzgerald, 2004].

La plupart des coxibs en développement dans l'industrie pharmaceutique, ou en cours d'enregistrement auprès des autorités sanitaires, ont des structures proches de ces premières molécules, dont elles conservent la structure tricyclique et les groupements fonctionnels méthylsulfone pour l'étoricoxib (Arcoxia®) [Cochrane et coll, 2002] ou sulfonamide pour le valdécoxib (Bextra®) [Ormrod et coll, 2002] et sa pro-drogue injectable le parécoxib (Dynastat®)

[Stichtenoth et Frolich, 2003], et ne diffèrent principalement que par la nature de l'hétérocycle central : pyridinyl pour l'étoricoxib au lieu de furanone pour le rofécoxib, isoxazole pour le valdécoxib au lieu de pyrazole pour le célécoxib. Cependant, l'homogénéité structurale du groupe des coxibs n'est pas définitive puisque de nouvelles structures chimiques font leur apparition comme le lumiracoxib (Prexige®) [Ding et Jones, 2002], actuellement en cours d'enregistrement par la FDA, qui est une molécule proche du diclofénac ayant un squelette d'acide phénylacétique et dépourvu de groupements sulfonés.

Ces « nouveaux » coxibs, parfois appelés coxibs de « deuxième génération » [Stichtenoth et Frolich, 2003], se distinguent des précédents par 2 caractéristiques essentielles [Cochrane et coll, 2002; Ding et Jones, 2002; Ormrod et coll, 2002; Stichtenoth et Frolich, 2003] : 1) une sélectivité accrue vis à vis de COX-2 (indice de sélectivité supérieur à celui du célécoxib pour le valdécoxib, et nettement supérieur à celui du rofécoxib pour l'étoricoxib et le lumiracoxib) ; 2) une rapidité d'action plus grande, cohérente avec des T_{max} plus courts (1 h pour étoricoxib, 2 à 3 h pour valdécoxib et lumiracoxib au lieu de 2 à 4 h pour célécoxib et rofécoxib), qui améliore leur efficacité dans la prise en charge de la douleur. Ces molécules ont, par ailleurs, des caractéristiques pharmacocinétiques qui les distinguent entre elles comme leur demi-vie (3 à 6 h pour le lumiracoxib, 5 à 10 h pour le valdécoxib, 22 h pour l'étoricoxib) ou leur biotransformation hépatique (dépendante majoritairement du CYP-3A4 pour l'étoricoxib et des CYP-3A4 et 2C9 pour le valdécoxib).

Tableau III : Caractéristiques pharmacocinétiques des AINS utilisés dans la partie expérimentale

	ASPIRINE	CELECOXIB	INDOMETACINE	KETOPROFENE	SULINDAC
Poids moléculaire	180,16 138,12 [1]	381,38	357,79	254,28	356,41 340,41 [2]
Posologies (mg par jour)	100-6000	200-400	75-200	75-300	200-400
Biodisponibilité (%)	68	-	100	90	90
T max (h) *per os*	0,25-0,4	2-3	2	1,5-6	2-4 [2]
Liaison protéique	70-80	97	90	99	93 98 [2]
Volume de distribution (l/kg)	0,15-0,2	7,14	0,34-1,57	0,1	
Demi-vie (h)	0,33	8-12	2,6-11,2	1,1-5,4	7,8 16,4 [2]
Excrétion urinaire	95	27	60	50-90 [3]	50 [4]
Excrétion fécale	traces	57	33	1-8 [3]	25 [4]
Concentration plasmatique (mg/l)	12-16 110-160 [1]	0,705	0,5-4,9	0,4-6	3-6
Concentration plasmatique (µM)	≤ 90 ≤ 1150	1,84	1,4-13,7	1,6-23,6	8,8-17,6 [2]

[1] acide salicylique [2] sulfure de sulindac [2] sur 5 jours [3] sur 4 jours

I.E.3. Base de la sélectivité d'inhibition des COXs par les coxibs

Les études cristallographiques aux rayons X (1ère cristallisation de COX-1 ovine en 1994 [Picot et coll, 1994] et de COX-2 humaine en 1996 [Kurumbail et coll, 1996]) ont révélé l'existence de différences structurales subtiles entre les 2 isoenzymes [Garavito et DeWitt, 1999], qui permettent d'expliquer la sélectivité du célécoxib vis à vis de la COX-2.

Les COXs existent sous la forme d'un homodimère asymétrique, chaque monomère comportant 3 domaines structuraux distincts : un module "EGF-like", un domaine de liaison à la membrane et un domaine catalytique formant un long canal hydrophobe.

Cependant, des différences ponctuelles sur quelques acides aminés du site actif jouent un rôle discriminant dans l'encombrement stérique du canal hydrophobe. Dans COX-1, l'Arg^{120} présente à l'entrée du canal hydrophobe et maintenue dans un état ionisé par formation d'un pont salin avec le Glu^{524}, joue un rôle primordial dans la liaison et l'orientation de l'acide arachidonique et des AINS classiques dans le site actif. En effet, une liaison ionique s'établit entre le groupement guanidino de l'Arg^{120} et le groupement acide carboxylique des ligands. En revanche, cette Arg^{120} n'est pas discriminante pour la fixation du célécoxib dans le site de la COX-1 en raison du caractère non acide de la molécule, et de la difficulté de celle-ci à pénétrer dans le site actif (encombrement stérique). Dans COX-2, comme l'entrée du canal hydrophobe est plus large, l'Arg^{106} (équivalent de Arg^{120} dans COX-1) intervient de façon moins prédominante dans le positionnement des AINS carboxyliques dans le site actif et, a fortiori, dans celui du célécoxib. D'ailleurs, l'absence d'interaction charge-charge entre le célécoxib et l'Arg^{106} favorise la rupture du pont salin entre l'Arg^{106} et le Glu^{510} dans COX-2, ce qui entraîne également une modification conformationnelle de COX-2 entre le domaine de liaison à la membrane et le domaine catalytique.

De plus, la substitution de l'Ile^{523} de COX-1 par un acide aminé moins volumineux (Val^{509}) dans COX-2 crée une poche latérale supplémentaire dans le site actif de COX-2 (hypothèse de la "side-pocket"). L'accessibilité de cette poche latérale est d'ailleurs accrue par la substitution de l'Ile^{434} dans COX-1 par une Val^{420} dans COX-2, car ceci autorise une flexibilité supplémentaire à la Phe^{504}, située à l'entrée de cette poche latérale et contre laquelle vient buter le volumineux groupement sulfonamide du célécoxib. Le positionnement de ce groupement sulfonamide dans la poche latérale de COX-2 est également stabilisée par son interaction directe avec l'Arg^{499} [DeWitt, 1999] et par l'orientation globale de la molécule de célécoxib dans le canal hydrophobe (position perpendiculaire stabilisée par le groupement trifluorométhyl) [Habeeb et coll, 2000].

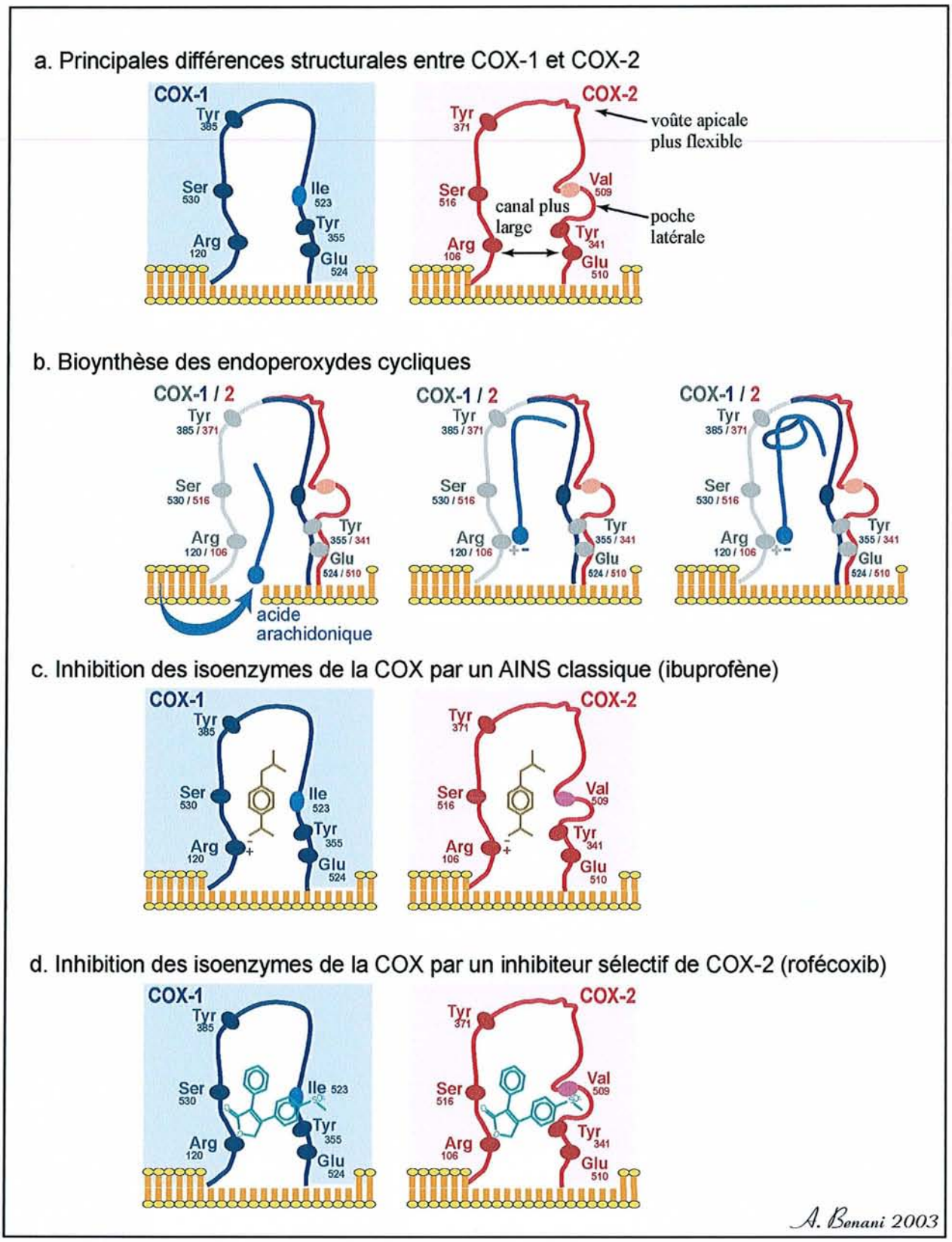


Figure 9 : Mécanismes d'inhibition des COXs par les AINS

I.F. L'HYPOTHESE COX-3

Nettement plus satisfaisant que la notion d'une seule cyclooxygénase, le modèle COX-1/COX-2 ne rend cependant pas compte de tous les résultats observés. En particulier, bien que le paracétamol soit antipyrétique et antalgique comme les AINS, son activité anti-inflammatoire est très réduite [Botting, 2000]. Par ailleurs, le paracétamol inhibite de façon plus importante l'activité cyclooxygénase dans des homogénats de cerveau de chien que dans des homogénats de rate [Flower et Vane, 1972]. Ceci a fait émerger l'idée qu'il existe des variants des isoenzymes COX, de sensibilité différente au paracétamol, dont l'action serait essentiellement centrale [Willoughby et coll, 2000]. Une nouvelle isoenzyme, COX-3, ainsi que deux protéines dérivées de COX-1, ont été caractérisées récemment [Chandrasekharan et coll, 2002]. Cette COX-3, issue du gène COX-1 dont un intron persiste dans l'ARNm, est sélectivement inhibée par le paracétamol. Un nouveau concept émerge ainsi, dans lequel deux gènes distincts, COX-1 et COX-2, donnent naissance à de multiples isoenzymes, expliquant certaines différences entre les AINS, et avec le paracétamol [Warner et Mitchell, 2002].

I.G. AUTRES MECANISMES D'ACTION DES AINS

I.G.1. Découplage de la phosphorylation oxydative

A des concentrations cellulaires élevées, pouvant être atteintes aux posologies anti-inflammatoires, les AINS classiques découplent le processus d'oxydation de celui de la phosphorylation qui sert à la formation de l'ATP par la mitochondrie [Miyahara et Karler, 1965]. Ce mécanisme a été proposé comme une explication de la toxicité digestive des AINS, notamment au niveau intestinal [Mahmud et coll, 1996a; Somasundaram et coll, 1995]. Selon cette hypothèse, les AINS découplent la phosphorylation oxydative, entraînant une diminution des taux d'ATP intracellulaires [Kasbekar, 1973; Somasundaram et coll, 1992]. Ceci est responsable d'une désorganisation du cytosquelette au niveau des jonctions serrées et d'une augmentation de la perméabilité de la muqueuse. La fuite concomitante de calcium depuis les mitochondries déclenche la formation d'espèces radicalaires de l'oxygène, dont les effets délétères accentuent les changements de perméabilité [Madara et coll, 1990]. L'inhibition des COXs, locale et systémique, intervient parallèlement en prévenant la cicatrisation de la muqueuse, par ses conséquences sur le flux sanguin, la prolifération cellulaire, et la production de mucus et de bicarbonates [Mahmud et coll, 1996b].

Le découplage de la phosphorylation oxydative est lié aux propriétés physicochimiques des AINS. En tant qu'acides faibles, ils existent dans l'estomac sous une forme non ionisée, lipophile, qui leur permet de pénétrer dans les cellules épithéliales. Dans celles-ci, les AINS sont dissociés sous une forme ionisée, qui agit comme piégeur d'ions H^+ [Schoen et Vender, 1989]. Ce caractère protonophore repose sur le groupement acide des AINS (carboxylique ou équivalent). L'effet découpleur est inversement corrélé au pKa des AINS classiques, et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 en sont *a priori* dépourvus [Mahmud, 1995].

I.G.2. Action sur les fonctions des polynucléaires neutrophiles

L'activation des neutrophiles comprend à la fois leur margination, et leur migration à travers les capillaires sanguins (diapédèse) et la production de prostaglandines, de leucotriènes, de radicaux dérivés de l'oxygène, ainsi que la libération d'enzymes lysosomiales. Les AINS peuvent moduler les fonctions des polynucléaires, en particulier en réduisant leur migration vers le foyer inflammatoire [Abramson et Weissmann, 1989; Furst, 1994].

II. L'APOPTOSE OU MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE

II.A. DEFINITION

La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme. Ainsi au cours des nombreuses mitoses et différenciation cellulaires qui permettront de créer un organisme à partir d'un œuf, il est en permanence nécessaire d'éliminer les cellules superflues ou potentiellement dangereuses. Ce phénomène d'élimination sélective des cellules est médié par un processus appelé apoptose (dont l'étymologie fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne : *apo* pour éloignement et *ptose* pour chute). La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr [Kerr et coll, 1972] pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique, la nécrose étant la seule forme de mort cellulaire connue et individualisée à cette époque [Ricci, 2000].

L'apoptose est une réponse hautement conservée des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères. Physiologiquement, l'apoptose est mise en jeu lors du développement et de l'homéostasie, comme mécanisme de défense, notamment en cas d'agression virale et lors du vieillissement cellulaire. Une dérégulation de la mort cellulaire programmée peut être à l'origine de nombreuses pathologies : certaines sont liées à une inhibition de l'apoptose (cancer, syndromes lymphoprolifératifs,...) alors que d'autres sont associées à une stimulation de ce phénomène (SIDA, maladies neurodégénératives, maladies auto-immunes,...) [Thompson, 1995].

II.B. DESCRIPTION GENERALE

La cellule nécrotique gonfle et sa chromatine prend l'allure d'une masse floconneuse qui finit par disparaître pour laisser un noyau fantôme. L'ADN cellulaire est dégradé de façon aspécifique et se présente sous forme d'une traînée ("smear") lors d'une séparation sur gel d'agarose.

Par opposition à la nécrose, l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire "ordonnée", procédant par différentes phases [Duvall et Wyllie, 1986; Kerr et coll, 1972]. Tout d'abord les cellules en apoptose vont s'isoler des autres cellules (perte des contacts entre les cellules). L'un des points morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire. La chromatine est soumise à l'action de différentes endonucléases qui clivent l'ADN en fragments de

300 à 500 kb dans un premier temps, puis en fragments de 180 kb. La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement notamment grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire (externalisation). La mort cellulaire programmée est un processus rapide (quelques heures). L'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire et ainsi prévenir tout dommage infligé aux tissus alentours. Toutefois, l'inflammation n'est pas nécessairement totalement absente durant l'apoptose (en raison du relarguage de l'IL-1 et IL-18 dans l'environnement), mais il s'agit d'une inflammation régulée [Ricci, 2000; Zornig et coll, 2001].

La mort cellulaire programmée a été décrite dans de nombreux organismes pluricellulaires, notamment des végétaux, des nématodes, des insectes et des vertébrés. Cependant, la majeure partie de nos connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires de la régulation de l'apoptose provient de travaux menés sur le nématode *Cænorhabditis elegans* [Hengartner et Horvitz, 1994].

II.C. MODELE DE MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE : *CÆNORHABDITIS ELEGANS*

La sélection par mutagenèse chimique de larves présentant des défauts d'élimination des cellules au cours du développement a permis l'identification de 11 gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire programmée chez C. elegans. Parmi ceux-ci, 3 furent identifiés comme des régulateurs-clé de l'apoptose dans toutes les cellules somatiques : *ced* (cell death defective)-3 et *ced*-4 sont indispensables à l'accomplissement de la mort cellulaire, alors que *ced*-9 intervient comme antagoniste des 2 premiers. Le gène *ced*-3 code une protéine Ced-3 présentant une forte homologie avec une protéase à cystéine (ou caspase : cysteine aspartyl protease), l'enzyme de conversion de l'interleukine-1β (ICE, actuellement caspase-1). La protéine Ced-4 interagit avec les protéines Ced-3 et Ced-9 au sein d'un complexe dit "apoptosome" [Chinnaiyan et coll, 1997b] : elle joue le rôle d'une protéine "chaperon" facilitant l'autoactivation de Ced-3 [Chinnaiyan et coll, 1997a], action inhibée s'il y a interaction de Ced-4 avec Ced-9. Des homologues chez les mammifères ont été identifiés : Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) pour Ced-4 et les protéines de la famille Bcl-2 pour Ced-9 [Zou et coll, 1997].

II.D. MECANISMES MOLECULAIRES DE LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE

Si le schéma général est très conservé entre nématodes et mammifères, il s'est néanmoins enrichi chez les mammifères de multiples gènes, tant pour la famille Bcl-2 (plus de 19 gènes connus) que pour celle des protéases de la famille ICE/Ced-3. Les caspases constituent l'effecteur ultime et principal des voies de transduction d'un signal apoptotique.

II.D.1. Les caspases : effecteurs centraux

Les caspases sont des protéases qui possèdent toutes un site catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine inclus dan une séquence pentapeptidique de type QACRG[1], leur conférant une spécificité de reconnaissance et de clivage au niveau de résidus aspartate en position P_1.
Le *C* représente la cystéine du centre actif (QACxG) et *aspase* définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique. Cette spécificité de clivage n'est partagée qu'avec une seule autre protéase, le granzyme B, une sérine protéase présente dans les lymphocytes T cytotoxiques. L'ICE, qui fut chronologiquement la première caspase caractérisée, a donc été rebaptisée caspase 1. A ce jour 14 caspases ont été identifiées (Figure 10).

a) Structure

Toutes les caspases ont une structure très conservée comprenant un prodomaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (p20, qui porte le centre actif) et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité (p10). Certains membres de la famille des caspases possèdent un domaine de liaison entre la grande et la petite sous-unité. Les prodomaines sont variables, à la fois dans leur taille et dans leur séquence. Ainsi les caspases 3, 6 et 7 ont un petit prodomaine alors que les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 possèdent un grand prodomaine. Les caspases à petits prodomaines sont souvent regroupées sous le nom de caspases effectrices. Ces caspases sont activées par des caspases dites initiatrices. Les prodomaines semblent jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines. Ainsi les prodomaines des caspases 8 et 10 contiennent des Domaines Effecteurs de Mort Cellulaire (ou Death Effector Domains : DEDs) qui sont des structures permettant la liaison de la caspase aux molécules adaptatrices FADD [Boldin et coll, 1995; Chinnaiyan et coll, 1995] ou TRADD [Hsu et coll, 1995].

[1] Q : Gln, A : Ala, C : Cys, R : Arg, G : Gly

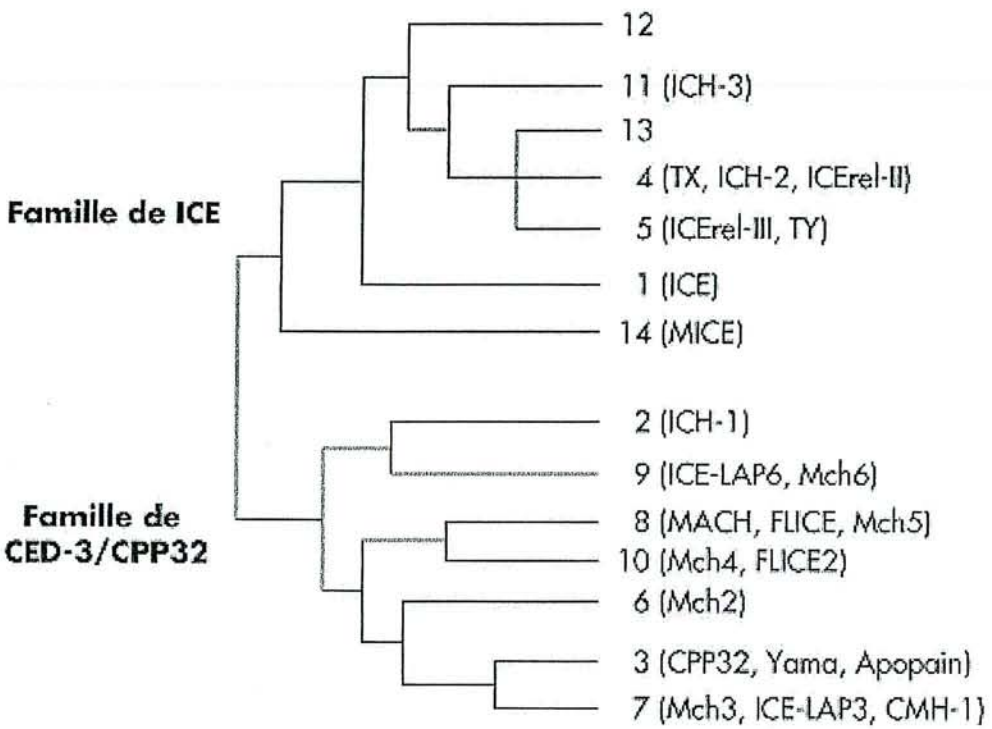


Figure 10 : Nomenclature des caspases [Ségal-Bendirdjian, 1999]

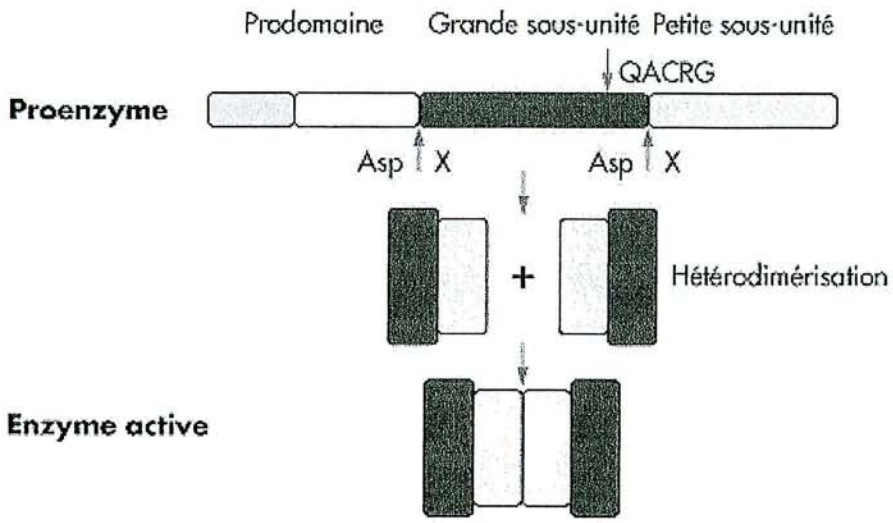


Figure 11 : Structure et activation des caspases [Ségal-Bendirdjian, 1999]

Certaines autres caspases (caspases 1, 2, 4 et 9) possèdent un Domaine de Recrutement des Caspases (ou Caspase Recruitment Domain : CARD [Hofmann et coll, 1997]). Ces CARDs jouent un rôle dans l'interaction entre caspases ainsi qu'avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices. Récemment, un nouveau motif appelé Domaine Inducteur de Mort Cellulaire (ou Death-Inducing Domain : DID) a été identifié [Chang et Yang, 2000; Hu et Yang, 2000].

b) Activation

La conversion de la caspase à l'état de zymogène en une enzyme mature nécessite au moins deux clivages au niveau de liaison Asp-X. Ces clivages successifs ont lieu de manière séquencielle : coupure entre la grande et la petite sous-unité puis libération du prodomaine. La caspase va alors pouvoir s'assembler sous sa forme active, composée de deux grandes et de deux petites sous-unités.

La structure générale ainsi obtenue est $(p10/p20)_2$ [Rotonda et coll, 1996; Walker et coll, 1994; Wilson et coll, 1994] (Figure 11). Chaque hétérodimère p10-p20 forme un unique domaine globulaire dont le cœur est composé d'un « six strand » feuillet β encadré par des hélices α. Les deux hétérodimères s'associent grâce à des interactions entre les sous-unités p10. Les caspases vont pouvoir s'auto-activer et/ou être activées par d'autres caspases au cours d'une cascade d'activation. Ainsi une fois les caspases initiatrices activées, elles vont pouvoir cliver d'autres caspases encore à l'état de zymogène (notamment les caspases effectrices). Ce type d'activation en cascade permet probablement la régulation et l'amplification du signal.

c) Substrats

Selon leur spécificité de substrat, les caspases peuvent être subdivisées en trois groupes [Chang et Yang, 2000] : le motif de reconnaissance privilégié du premier groupe est WEHD[2]. Ce groupe comprend la caspase-1 et ses homologues proches, les caspases-4 et -5. Le second groupe préfère la séquence DEXD (où X représente une valine, une thréonine ou une histidine), avec une grande sélectivité pour l'acide aspartique en position P_1. Ce second groupe est formé de caspases apoptotiques possédant des prodomaines longs ou courts (caspase-2, -3 et -7). Le troisième groupe (caspase-6, -8, -9 et -10) reconnaît préférentiellement le motif (L/V)EXD[3], proche de la séquence de clivage des caspases effectrices, ce qui confirme le rôle initiateur des caspases-8, -9 et -10.

[2] W : Trp, E : Glu, H : His, D : Asp

[3] L : Leu, V : Val

Les substrats clivés par les caspases sont nombreux et variés. Parmi ceux-ci se trouvent des protéines pro- ou anti-apoptotiques, des protéines structurales ou participant à l'homéostasie cellulaire, des protéines intervenant dans la signalisation, la réparation cellulaire ou la synthèse de macromolécules [Zornig et coll, 2001].

Par exemple, la transactivation de procaspases par des caspases déjà activées peut générer une activité protéolytique suffisante pour déborder les capacités des inhibiteurs endogènes des caspases tels que les IAPs (inhibitor of apoptosis proteins). La caspase-3 clive Bcl-2 et Bcl-x_L, détruisant la fonction anti-apoptotique de ces protéines et entraînant le relarguage des fragments C-terminaux pro-apoptotiques. La caspase-8 clive Bid, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, générant un fragment C-terminal qui induit la libération de cytochrome *c* à partir de la mitochondrie. La caspase-3 clive ICAD/DFF45, ce qui permet à la nucléase CAD, initialement liée à ICAD, de transloquer jusqu'au noyau et de scinder l'ADN. La caspase-3 clive et active aussi Gelsolin, une protéine qui régule la dynamique de l'actine et qui intervient comme promoteur de l'apoptose au niveau du cytoplasme et du noyau, notamment avec la fragmentation de l'ADN. Les lamines sont des protéines de structure importantes au sein de l'enveloppe nucléaire et leur clivage par la caspase-6 entraîne une partie des changements morphologiques du noyau apoptotique. Le clivage de la β-caténine et de FAK pourrait interrompre les interactions cellule-cellule ou cellule-complexes d'adhésion focale, facilitant ainsi la phagocytose ultérieure. Le clivage de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) perturbe son rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire en tant qu'enzyme de réparation des cassures de la double hélice d'ADN, ce qui pourrait faciliter la dégradation de l'ADN [Zornig et coll, 2001].

Le clivage protéique de chacun de ces substrats pris un à un ne semble pas avoir de conséquences majeures pour la cellule. Par contre, le clivage simultané de nombreuses protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette de la cellule, la réparation de l'ADN ou la synthèse des membranes est responsable de l'accomplissement de la phase ultime de l'apoptose.

d) Régulation des caspases

Phosphorylation et nitrosylation

L'activité des caspases peut être modulée par phosphorylation. Ainsi, la caspase-9 peut être phosphorylée (et inhibée) par Akt, une protéine kinase à sérine/thréonine impliquée dans la suppression de l'apoptose médiée par les récepteurs aux facteurs de croissance. Une S-nitrosylation a été observée au niveau du site actif de la procaspase-3. Durant l'apoptose médiée par Fas, il y a dénitrosylation, avec augmentation de l'activité de la caspase-3 activée [Chang et Yang, 2000].

Compartimentalisation

Les différentes procaspases sont présentes dans différents compartiments intracellulaires, et cette localisation change au cours du processus apoptotique. Durant l'apoptose médiée par Fas, la procaspase-8 est recrutée depuis le cytosol vers le complexe du récepteur Fas où elle est activée. De même, lors de l'apoptose induite par le TNF, l'activation de la procaspase-1 se fait après translocation du cytoplasme vers le noyau [Chang et Yang, 2000].

Inhibiteurs naturels

Les virus ont développé diverses stratégies très efficaces afin d'inhiber la mort cellulaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées dans le but d'achever leur cycle de réplication et ainsi infecter de nouvelles cellules. Les inhibiteurs viraux agissent directement sur les caspases, comme la protéine CrmA (cytokine response modifier A) des virus Cowpox ou p35 des baculovirus, ou indirectement en inhibant les interactions entre les caspases et leurs protéines adaptatrices (v-FLIP : viral FLICE-inhibitory protein) [Chang et Yang, 2000].

CrmA est une serpine directement dirigée contre le site actif des caspases matures. Après son clivage par une caspase, CrmA reste liée et bloque le site actif. Son action est limitée aux caspases des groupes I et III (sauf la caspase-6) et le granzyme B [Zhou et coll, 1997]. D'une façon similaire, p35 intervient comme substrat suicide pour les caspases activées [Xue et Horvitz, 1995].

Au contraire de CrmA et p35, les IAPs ne sont pas des inhibiteurs spécifiques de site actif, et leur inhibition de l'apoptose ne requiert pas de clivage par les caspases. Deux IAPs, Op-IAP et Cp-IAP, existent chez les baculovirus et jouent un rôle similaire à celui de p35. Alors que les homologues cellulaires de CrmA et p35 n'ont pas été identifiés jusqu'à présent, les IAPs cellulaires représentent une famille majeure de régulateurs de caspases. A ce jour, huit IAPs ont été découverts chez les mammifères : ils agissent sur une caspase initiatrice, la caspase-9, et sur des caspases effectrices (caspases-3 et -7) [Deveraux et Reed, 1999]. L'unité fonctionnelle des IAPs est un domaine BIR (baculoviral IAP repeat), constitué d'environ 80 acides aminés entourant un atome de zinc et généralement répété trois fois. Les IAPs établissent une liaison réversible avec les caspases, et un blocage du site actif par les domaines BIR [Shi, 2002]. Pendant l'apoptose, l'inhibition des caspases médiée par les IAPs est supprimée par une protéine mitochondriale, Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP-binding protein with low pl) [Chai et coll, 2000].

Les protéines v-FLIPs constituent un autre groupe d'inhibiteurs viraux de l'apoptose. Elles possèdent deux domaines DED similaires à ceux de la région N-terminale de la procaspase-8. Les v-FLIPs

inhibent l'apoptose médiée par les récepteurs de mort par compétition avec les procaspases pour le recrutement au sein du complexe du récepteur de mort [Chang et Yang, 2000].

II.D.2. Voies d'induction de l'apoptose

La cellule a élaboré au moins deux voies principales d'induction de l'apoptose, qu'il s'agisse d'une stimulation des récepteurs de mort à la surface cellulaire, ou d'une perturbation des fonctions mitochondriales. Ces deux voies utilisent des mécanismes similaires pour activer les caspases initiatrices, par l'assemblage de différentes molécules en larges complexes protéiques [Cain et coll, 2002].

a) La voie de la mitochondrie

La mitochondrie est la cible commune à plusieurs molécules transductrices de signaux qui peuvent provoquer la perméabilisation des membranes mitochondriales (Figure 12). Ce sont par exemple les seconds messagers des réponses au stress, incluant le céramide et son dérivé le ganglioside GD3, des acides gras (palmitate) et leurs produits d'oxydation, les espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde), le monoxyde d'azote (NO), ainsi que le calcium [Haouzi et Kroemer, 2001; Kroemer et Reed, 2000]. Par ailleurs, de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose sont normalement localisées dans les mitochondries, avant toute induction d'apoptose. Ceci concerne une collection hétérogène de protéines comme la protéine kinase A (attachée à une protéine d'ancrage mitochondriale spécifique), la kinase A-RAF-1 (liée à la machinerie d'import des protéines mitochondriales), Grb10 (qui interagit avec la protéine Raf-1 mitochondriale), CIDE-B (homologue de ICAD), la porine ou VDAC (voltage-dependent anion channel), ainsi que le translocateur de nucléotides à adénine (ANT) [Ferri et Kroemer, 2001]. De plus, les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, dont Bcl-2 et Bcl-x_L, sont normalement présents dans les membranes mitochondriales où ils exercent un effet inhibiteur sur la perméabilisation des membranes mitochondriales. Certains analogues pro-apoptotiques de Bcl-2, tel que Bak, seraient également associés aux membranes mitochondriales dans lesquelles ils s'insèreraient complètement sous l'effet d'un signal pro-apoptotique (perméabilisation des membranes mitochondriales) [Wei et coll, 2000]. Parmi les protéines participant à la transduction de signaux létaux, un grand nombre se redistribue dans les mitochondries, comme cela a été observé pour les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2/Bax/Bid. Ainsi, la protéine Bax cytosolique s'insère dans la membrane externe des mitochondries, processus qui s'accompagne de changements conformationnels avec oligomérisation. La protéine Bid cytosolique peut être activée par clivage protéolytique (caspase-8), et le produit de clivage, la protéine Bid tronquée (t-Bid) s'intègre dans les membranes mitochondriales en

interagissant avec Bax ou Bak [Eskes et coll, 2000]. Certaines protéines qui se redistribuent dans les mitochondries peuvent modifier de façon covalente des protéines de la famille Bcl-2/Bax/Bid, affectant par là même leur capacité à contrôler localement l'apoptose et leur localisation subcellulaire. C'est le cas de la kinase c-Jun (JNK, ou SAPK : stress-activated protein kinase) qui phosphoryle et inactive la protéine anti-apoptotique Bcl-xL [Kharbanda et coll, 2000]. Enfin, certains facteurs de transcription, comme TR3 (facteur de transcription de la super-famille des récepteurs des hormones stéroïdes/thyroïdiennes) ou p53 (activant des gènes pro-apoptotiques incluant ceux de la famille Bcl-2) subissent une translocation du noyau vers les mitochondries [Ferri et Kroemer, 2001].

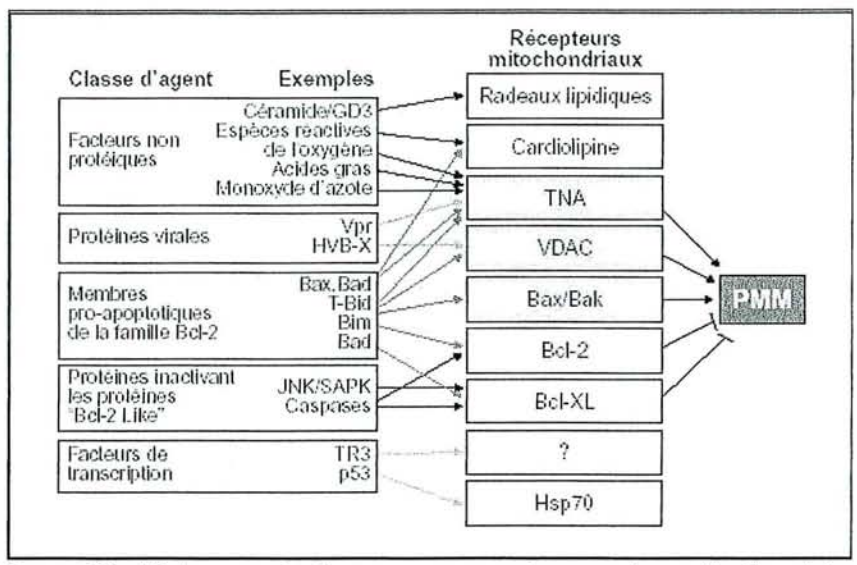


Figure 12 : Voies apoptotiques convergentes vers les mitochondries.

Les mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales et de libération de facteurs mitochondriaux comme le cytochrome *c* restent encore à l'étude [Kroemer et Reed, 2000; Zornig et coll, 2001] (Figure 13). Différentes études suggèrent une perméabilité spécifique de la membrane mitochondriale externe, sans altération de la membrane mitochondriale interne [Goldstein et coll, 2000]. Plusieurs modèles tentent d'expliquer la façon dont la perméabilisation de la membrane mitochondriale est médiée durant l'apoptose. La membrane mitochondriale externe pourrait se rompre après gonflement de la matrice mitochondriale. Dans ce modèle, le gonflement résulte de l'ouverture d'un "mégacanal", le PTP (permeability transition pore) dont deux éléments majeurs sont l'ANT, localisé dans la membrane mitochondriale interne, et le VDAC, présent dans la membrane mitochondriale externe. Cette ouverture permettrait à l'eau et aux solutés d'entrer dans la mitochondrie, augmentant ainsi le volume de la matrice mitochondriale. Bax entraînerait l'ouverture du PTP à l'issue d'une interaction avec l'ANT [Marzo et coll, 1998]. Dans un autre modèle, le

gonflement de la matrice résulterait d'une perturbation des échanges ADP/ATP après fermeture du VDAC, entraînant une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale interne. Certains modèles n'envisagent pas de rupture de la membrane mitochondriale externe mais la formation de pores en son sein, permettant le passage dans le cytosol du cytochrome *c* et d'autres protéines mitochondriales. Ainsi, l'oligomérisation de Bax permet la formation de canaux dans les bicouches lipidiques [Martinou et coll, 2000]. Bax pourrait également intervenir dans une perméabilisation spécifique de la membrane mitochondriale externe, résultant d'une interaction directe avec le VDAC [Shimizu et coll, 1999].

Deux autres protéines d'importance sont libérées en même temps que le cytochrome *c* : Smac/DIABLO, qui facilite l'activation des caspases en abolissant leur inhibition par les IAPs, et l'AIF (apoptosis inducing factor), flavoprotéine de 57 kDa, qui est redistribuée de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol, puis vers le noyau où elle intervient dans la condensation de la chromatine [Susin et coll, 1999]. Des expériences complémentaires placeraient en fait l'AIF en amont/en parallèle de la séquence cytochrome *c* / activation des caspases [Susin et coll, 2000].

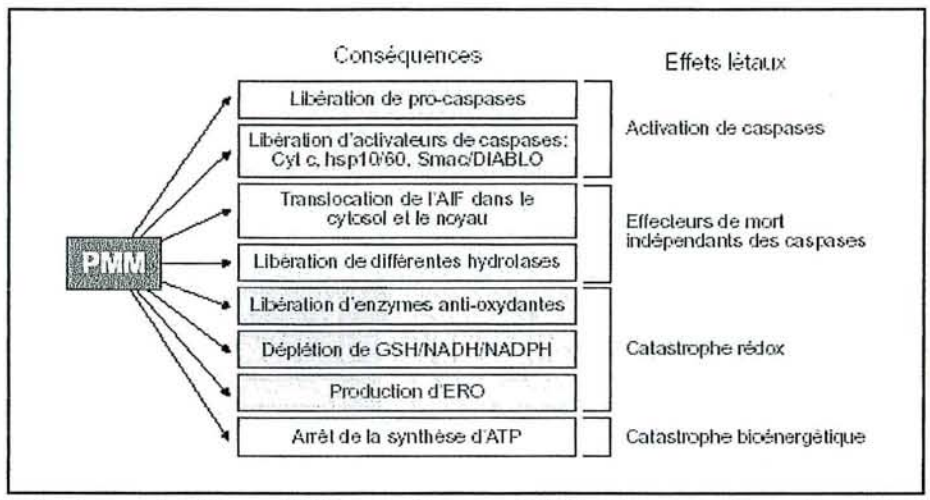


Figure 13 : Voies exécutrices ciblées par la perméabilisation membranaire mitochondriale

L'activation des caspases par le cytochrome *c* se fait par l'intermédiaire d'un large complexe appelé apoptosome, dont l'élément majeur est un homologue de Ced-4 : Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor-1) [Cain et coll, 2002]. Cette protéine d'environ 130 kDa possède, comme Ced-4, un domaine N-terminal CARD qui interagit avec celui de la procaspase-9 [Li et coll, 1997]. Apaf-1 peut former des oligomères sous l'action du dATP et du cytochrome *c*. En effet, Apaf-1 possède une longue région C-terminale, comprenant une douzaine de motifs répétés WD-40, que l'on retrouve dans de nombreuses protéines et qui interviendraient dans les interactions protéine-protéine. Ces

motifs WD-40 ont un effet inhibiteur sur le reste de la protéine : la liaison du dATP et du cytochrome *c* à Apaf-1 antagonise cet effet inhibiteur, ce qui permet l'oligomérisation de Apaf-1 et la liaison à plusieurs molécules de procaspase-9 (ratio 1:1) [Li et coll, 1997; Zou et coll, 1999]. Au sein de ce complexe, les molécules de procaspase-9 sont activées par autoclivage. Il y a alors activation des procaspases-3 [Srinivasula et coll, 1998].

b) La voie des récepteurs de mort

Cette voie de mort cellulaire programmée joue un rôle primordial dans la régulation de la réponse immunitaire. Les récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TNF-R). Les membres de cette famille sont nombreux : TNF-R1, TNF-R2, TNF-R3, LT-αR, CD27, CD28, CD30, CD40, Rank, DR6, les récepteurs TRAIL, et particulièrement CD95 (Fas, Apo-1), un des premiers récepteurs de mort étudiés. L'activation de ces récepteurs est responsable d'une grande variété de réponses cellulaires, dépendant du type cellulaire et du contexte, et comprenant activation, stimulation, prolifération, différenciation ou apoptose [Zornig et coll, 2001].

Les membres de la famille du TNF-R sont des protéines transmembranaires de type I possédant dans leur domaine extracellulaire de une à six régions riches en cystéines, impliquées dans la liaison du ligand. Les récepteurs de mort possèdent dans leur partie intracellulaire une région conservée d'environ 80 acides aminés appelée domaine de mort cellulaire [Nagata, 1997; Ricci, 2000]. Les récepteurs existeraient sous de complexes préformés, liés par un domaine N-terminal du domaine de liaison du ligand (PLAD : pre-ligand binding assembly domain) [Chan et coll, 2000; Siegel et coll, 2000].

La famille des ligands du TNF comprend une quinzaine de membres (TNF, FasL, CD30L, TRAIL, Lymphotoxine,...). Ces ligands sont, en grande majorité, des protéines transmembranaires de type II, qui présentent leur extrémité C-terminale du côté extracellulaire et partagent une séquence d'environ 150 acides aminés intervenant dans la liaison au récepteur. Certaines de ces protéines, telle que FasL et TNF, existent également sous forme soluble [Zornig et coll, 2001].

Le récepteur Fas (CD95/Apo-1) est le récepteur de Fas ligand (FasL) et représente le prototype des récepteurs de mort. La stimulation de Fas (existant sous la forme d'un homotrimère) par son ligand physiologique, ou par un anticorps anti-Fas, va entraîner le recrutement, par l'intermédiaire de son domaine de mort cellulaire (DD), d'une protéine adaptatrice du cytosol, FADD/MORT-1 (Fas-associated death domain) qui possède, en plus de son DD, un domaine effecteur de mort cellulaire (DED) [Boldin et coll, 1995; Chinnaiyan et coll, 1995]. Ce DED interagit avec les domaines DED

de la procaspase-8 qui est alors recrutée vers les récepteurs Fas. L'ensemble Fas-FADD et la procaspase-8 forment un complexe appelé DISC (death-inducing signaling complex) qui conduit à une auto-activation protéolytique de la procaspase-8 : celle-ci active à son tour les caspases-1 et -3 [Kischkel et coll, 1995] ou clive d'autres protéines comme Bid.

Le TNF et la lymphotoxine LT sont les ligands de deux récepteurs, TNF-R1 et TNF-R2. Le TNF-R1 est capable, comme CD95, d'activer la cascade des caspases en recrutant la caspase-8 via FADD. La liaison FADD et TNF-R1 ne se fait pas directement, mais par l'intermédiaire d'une protéine comportant un DD, TRADD (TNF-R-associated death domain). Les récepteurs TNF-R1 et TNF-R2 recrutent également d'autres protéines adaptatrices de signal, les TRAFs (TNF-R-associated factors). Certaines de ces protéines TRAF interviennent dans l'activation de JNK ou de NF-κB [Inoue et coll, 2000; Zornig et coll, 2001] et interagissent avec les IAPs (cf infra).

II.D.3. Les régulateurs de la mort cellulaire

a) Mort cellulaire induite par les oncoprotéines

Un certain nombre d'oncoprotéines, lorsqu'elles sont surexprimées, induisent l'apoptose [Harrington et coll, 1994]. Les exemples les plus connus sont le facteur transcriptionnel c-Myc et la protéine adénovirale E1A, mais sont concernés également c-Jun [Bossy-Wetzel et coll, 1997] et c-Fos [Preston et coll, 1996], tous deux éléments du complexe transcriptionnel AP-1, ainsi que des protéines intervenant dans la progression du cycle cellulaire comme E2F1 et la cycline E. Selon les données actuelles, Myc serait capable de promouvoir la prolifération et l'apoptose en même temps : la voie apoptotique est supprimée aussi longtemps que des facteurs de survie envoient des signaux anti-apoptotiques. Ceci s'inscrit dans un modèle de régulation survie/mort cellulaire dans lequel la cellule se destine par défaut à l'apoptose, sauf si des cytokines induisent des signaux anti-apoptotiques [Zornig et coll, 2001]. L'induction de l'apoptose par c-Myc est médiée par son rôle de facteur transcriptionnel sur différents gènes-cible comme celui de l'ornithine décarboxylase (*ODC*) ou *cdc25A*. ODC est une enzyme intervenant dans la synthèse des polyamines nécessaires à la synthèse de l'ADN, alors que Cdc25A code une tyrosine phosphatase impliquée dans l'activation d'inducteurs-clé de la mitose, les complexes CDK (cyclin-dependent kinase). La surexpression de Myc, ou de ces deux protéines, dans des cellules privées de facteurs de croissance, entraîne leur apoptose. De même, TRAP-1 (TNF-R-associated protein) et Bax seraient des cibles potentielles de Myc [Coller et coll, 2000; Mitchell et coll, 2000]. Des liens entre c-Myc et d'autres voies d'apoptose ont été établis : c-Myc active p53 par l'intermédiaire de $p19^{ARF}$, une protéine codée par une "alternate reading frame" du gène suppresseur de tumeur p16 [Zindy et coll, 1998]. Il existe

également une interconnection entre la voie de c-Myc et celle de CD95/CD95L [Hueber et coll, 1997]. Enfin, c-Myc est capable d'entraîner la libération de cytochrome c dans le cytosol [Juin et coll, 1999].

b) Les protéines de la famille Bcl-2

Les homologies de séquence et de fonctions entre CED-4 et Bcl-2 semblent indiquer que les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle majeur dans la régulation des caspases et plus généralement de l'apoptose. La translocation t(14,18) retrouvée dans les lymphomes folliculaires de type B a conduit à l'identification de Bcl-2 chez l'homme [White, 1996]. La surexpression de Bcl-2 permet de bloquer l'apoptose induite par de nombreux stimuli (dommages de l'ADN, irradiations, expression d'oncogènes, glucocorticoïdes,...) [Yang et Korsmeyer, 1996].

Si l'on se réfère à leurs fonctions biologiques, on peut classer les membres de la famille Bcl-2 en deux sous-familles : des membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1, E1B19K, LMW5-HL, EBV BHRF1) et des membres pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bcl-X_S, Bad, Bid, Bik, Hrk, Bim, Bok) [Zornig et coll, 2001].

Cette famille se caractérise par la présence de domaines BH 1 à 4 (Bcl-2 homology domain) [Kelekar et Thompson, 1998]. La distribution de ces domaines permet de regrouper cette famille en trois classes :

- Les membres anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 présentent des homologies de séquence dans les domaines BH 1, 2, 3 et 4.
- Les membres pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bad, Bok présentent des homologies dans les séquences des domaines BH1, 2 et 3 mais pas ou peu dans les séquences BH4
- Les membres n'ayant qu'un seul domaine BH3. Ce sont des protéines pro-apoptotiques telle que Bik, Hrk, Bim, Blk, Bid et BNIP3. Elles présentent des homologies de séquence mais uniquement dans leur domaine BH3 [Baliga et Kumar, 2002].

La plupart des membres de la famille Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire ou une région d'ancrage à la membrane qui leur permet d'être localisés dans les membranes des différents compartiments cellulaires [Goping et coll, 1998]. Les molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L sont essentiellement situées au niveau de la membrane mitochondriale externe, ainsi que dans les membranes du noyau et du réticulum endoplasmique. La protéine pro-apoptotique Bax est normalement retrouvée dans le cytosol, mais durant l'apoptose, il y a translocation vers la membrane mitochondriale, où Bax s'oligomérise et s'insère pour former une protéine membranaire [Eskes et coll, 2000; Gross et coll, 1998]. Cette capacité à former des canaux ioniques par insertion dans les

membranes lipidiques a également été retrouvée chez Bcl-2 et Bcl-XL [Minn et coll, 1997; Schlesinger et coll, 1997]. Les membres pro-apoptotiques à domaine BH3 (Bid, Bad, Bim) sont présents dans le cytosol ou près du cytosquelette. Pendant l'apoptose, il y a translocation jusqu'à la mitochondrie où ils se lient et régulent l'activité des autres membres de la famille Bcl-2. Cette translocation se fait habituellement à un niveau posttraductionnel (clivage de Bid par la caspase-8) [Desagher et coll, 1999].

Une caractéristique importante des membres de la famille Bcl-2 est de pouvoir former des homo ou des hétérodimères. Les homodimères anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-X_L se font par l'intermédiaire des domaines BH1 et BH2 (Yin et al., 1994). Les membres pro-apoptotiques contenant un domaine BH3, comme Bax ou Bak, peuvent interagir avec Bcl-2 ou Bcl-X_L par l'intermédiaire à la fois de leur domaine BH3 mais aussi grâce à la poche hydrophobique formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 de Bcl-2 et Bcl-X_L (Chittenden et al., 1995; Zha H. et al., 1996; Sattler et al., 1997; Simonen et al., 1997). En fait, il semble que la balance entre la vie et la mort cellulaire soit influencée par le type et la proportion de dimères anti- ou pro-apoptotiques formés (Oltvai et al., 1993; Oltvai et Korsmeyer, 1994; Sedlak et al., 1995). Ainsi, lorsque Bax est préférentiellement exprimé, des homodimères Bax-Bax se formeront et conduiront à la mort cellulaire. En revanche, si c'est Bcl-2 qui est majoritairement exprimée alors il y aura formation de dimères Bcl-2-Bcl-2 et donc survie cellulaire.

c) P53

Le gène suppresseur de tumeur *p53* voit son fonctionnement inactivé dans près de 70% des tumeurs humaines [Evan et coll, 1995]. P53 intervient comme facteur transcriptionnel, notamment au cours de l'induction de l'apoptose ou de l'arrêt de la croissance cellulaire. Les taux de P53 augmentent rapidement au décours d'une altération de l'ADN, essentiellement en raison d'une stabilisation de la protéine P53, habituellement dégradée rapidement : cette élévation joue un rôle primordial au cours de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et de l'induction de la mort cellulaire programmée à la suite d'altérations de l'ADN [May et May, 1999]. Au cours de l'arrêt de la croissance, un effecteur majeur de P53 est la protéine P21 (WAF1-CIP-1), qui se lie et inhibe des kinases dépendantes des cyclines. D'autres gènes sont également induits lors de l'activation de P53 : *GADD45* et *MDM2*. *MDM2* intervient comme rétrocontrôle négatif de l'arrêt du cycle en se liant à p53, empêchant les interactions spécifiques avec l'ADN.

II.E. METHODES D'ETUDE DE L'APOPTOSE

Il est possible d'envisager d'étudier l'apoptose à différents stades, des désordres membranaires les plus précoces, aux altérations nucléaires les plus tardives. On peut ainsi étudier :

- la modification de la perméabilité mitochondriale (JC-1, rhodamine^{123}) par une modification de la balance monomères/oligomères du JC-1 et détection en fluorescence ;
- la perte de l'asymétrie membranaire (annexine V) par fixation de l'annexine V sur les phosphatidylsérines externalisées et détection en fluorescence ou par un système streptavidine-biotine ;
- la morphologie cellulaire par coloration nucléaire à l'acridine orange ;
- l'analyse du contenu en ADN par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium, avec détection du pic subG_1 ;
- la perte de viabilité cellulaire par coloration vitale au bleu trypan, ou mesure de l'activité des déshydrogénases mitochondriales par le test au MTT (sel de tétrazolium) [Park et coll, 1987];
- le démasquage de l'épitope 7A6 mitochondrial, généralement associé à une libération de cytochrome *c*, avec détection en cytométrie à l'aide de l'anticorps monoclonal APO2.7.
- la fragmentation de l'ADN mise en évidence par migration sur gel d'agarose des oligomères de 180 bp formant une "échelle" d'ADN ;
- la mise en évidence des extrémités 3'-OH libérées par la fragmentation de l'ADN par la technique Tunel (technique du 3'-OH end labeling) avec détection en fluorescence ou par un système steptavidine-biotine
- la mesure de l'activité de certaines caspases (3, 8, 9) en détectant la transformation d'un substrat fluorescent (Ac-DEVD aminomethylcoumarin).

III. RELATIONS ENTRE CANCER COLORECTAL, PROSTAGLANDINES ET AINS

III.A. DONNEES GENERALES SUR LE CANCER COLORECTAL

III.A.1. Epidémiologie

Le cancer colorectal représente la quatrième cause de cancer dans le monde, avec une incidence estimée en 2000, à 944 717 cas : 498 754 nouveaux cas diagnostiqués chez les hommes, 445 963 nouveaux cas chez les femmes, l'incidence étant plus importante chez l'homme que chez la femme (19,1 contre 14,4 pour 100 000 respectivement) [Boyle et Leon, 2002]. Le nombre de cas de cancer colorectal est en constante augmentation depuis 1975 [Boyle et Leon, 2002]. La fréquence de ce cancer varie largement dans le monde, avec des taux d'incidence variant d'un rapport 1 à 25, les taux les plus élevés étant rapportés par les registres d'Amérique du Nord, d'Europe occidentale et d'Australie. Des taux intermédiaires sont retrouvés en Europe de l'Est, des taux faibles en Asie et en Amérique latine. Les taux les plus bas sont signalés en Afrique [Parkin et Muir, 1992].

Les études sur différentes races ou ethnies, ainsi que sur les populations migrantes, suggèrent que des facteurs environnementaux jouent un rôle important dans l'étiologie de cette maladie. Ainsi, un groupe de migrants perd rapidement le risque lié à sa communauté d'origine, et acquiert les caractéristiques de la nouvelle communauté, généralement en une génération après son arrivée [Boyle et Leon, 2002].

III.A.2. Histopathologie

La forme anatomopathologique habituelle est celle de l'adénocarcinome développé aux dépens de l'épithélium des glandes de Lieberkühn [Hermanek, 1982]. La localisation tumorale la plus fréquente se situe au niveau du sigmoïde (44 % des cas) [Conroy et Adenis, 1998].

III.A.3. Terrain

La courbe d'incidence des cancers du côlon montre que la fréquence de ceux-ci augmente régulièrement avec l'âge ; en pratique, le risque existe dès l'âge de vingt ans mais devient appréciable à partir de 45 ans et double ensuite à chaque décennie. L'âge au moment du diagnostic se situe généralement vers 70 ans.

Soixante à 80 % des cancers du côlon se développent à partir d'une lésion tumorale précancéreuse : l'adénome colique. Le risque de transformation d'un adénome en cancer varie en fonction de la taille, du degré d'atypies cellulaires et de l'importance de la composante villeuse au sein de l'adénome. Le risque cumulatif de dégénérescence à 5, 10 et 20 ans d'un polype ≥ 1 centimètre, a été estimé à 2,5 %, 8 % et 24 % [Stryker et coll, 1987]. Les maladies inflammatoires du tube digestif (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) présentent également un risque de dégénérescence, essentiellement pour les pancolites anciennes (évoluant depuis plus de dix ans).
Enfin, certains caractères transmis de manière héréditaire, comme ceux des polyposes familiales ou des cancers familiaux sans polypose, sont susceptibles de conduire à un risque variable de cancer du côlon (10 % de formes familiales).

III.A.4. Pronostic

Le taux de survie (corrigée) à cinq ans, tous stades confondus, apprécié à partir du registre de Côte d'Or est de 39 % [Hillon et coll, 1985]. Le taux de survie à cinq ans, tous stades confondus, apprécié à partir de la population hospitalière des Centres de lutte contre le cancer est de 42 % ; 46 % pour les femmes et 38 % pour les hommes [Conroy et Adenis, 1998].

III.A.5. Classification

Si de nombreux facteurs pronostiques indépendants ont été décrits, seuls le degré d'envahissement tumoral transpariétal et ganglionnaire et la présence ou non de métastases apparaissent comme des facteurs pronostiques «utiles», c'est-à-dire dont le rôle décisionnel dans la prescription d'un traitement complémentaire à la chirurgie a été validé dans des essais thérapeutiques prospectifs. Ces facteurs pronostiques ont été intégrés dans des classifications comme celle de l'UICC (TNM 1987) ou celle de Dukes modifiée par Astler [Astler et Coller, 1954] puis adaptée par Turnbull [Turnbull et coll, 1967] ou encore la classification de Gunderson [Gunderson et Sosin, 1974]. En elles-mêmes, ces classifications post-thérapeutiques, éventuellement regroupées en stades, sont des facteurs indépendants de survie et/ou de récidive (Tableau IV).

Tableau IV

A. Classification commune UICC (TNM) et AJCC

Tumeur primitive (T) : - TX : tumeur non évaluable, - TO : pas de tumeur sur le prélèvement, - Tis : carcinome *in situ*, - T1 : atteinte de la sous-muqueuse, - T2 : atteinte de la musculeuse, - T3 : atteinte de la sous-séreuse, de la séreuse ou de la graisse péricolique, - T4 : atteinte de la cavité péritonéale à travers la séreuse ou extension par contiguïté à un organe de voisinage à travers la séreuse.
Adénopathies régionales(N) : - NX : adénopathies non précises, - N0 : pas d'adénopathies régionales*, - N1 : 1 à 3 adénopathies péricoliques métastatiques, - N2 : 4 ou + adénopathies péricoliques métastatiques, - N3 : adénopathies centrales (des troncs vasculaires) métastatiques.
Métastases à distance (M) : - MX : non précisé, - M0 : pas de métastases, - M1 : métastases.
Tumeur résiduelle (R) (AJCC) : - RO : berges de résection microscopiquement indemnes de tumeur résiduelle, - R1 : berges de résection microscopiquement envahies, - R2 : tumeur résiduelle macroscopique (constatation chirurgicale).
Regroupement en stades : - stade I : T1 N0 M0, T2 N0 M0, - stade II : T3 N0 M0, T4 N0 M0, - stade III : quel que soit le T, N1, N2 ou N3, M0, - stade IV : quel que soit le T ou le N, M1

* pN0 : l'examen histologique d'une lymphadénectomie régionale doit inclure au moins 12 ganglions lymphatiques

B. Classification post-chirurgicale d'Astler et Coller

Stade A	Atteinte muqueuse et sous-muqueuse
Stade B1	Atteinte de la musculeuse sans atteinte de la sous-séreuse
Stade B2	Atteinte de la musculeuse avec atteinte de la sous-séreuse, ou de la séreuse ou au-delà
Stade C1	B1 avec envahissement ganglionnaire
Stade C2	B2 avec envahissement ganglionnaire
Stade D	Métastases

III.A.6. Bilan diagnostique et préthérapeutique

La coloscopie avec biopsies est le seul examen qui peut diagnostiquer avec certitude le cancer du côlon. Le bilan préopératoire doit comporter un examen clinique complet, un bilan biologique, la recherche des antécédents familiaux, la recherche des lésions synchrones et des métastases (radiographie pulmonaire et échographie abdominale) [Conroy et Adenis, 1998].

III.A.7. Stratégie thérapeutique

La chirurgie est le traitement principal des cancers du côlon autour duquel doivent s'articuler le bilan et les traitements complémentaires ou adjuvants.

Le rôle de la radiothérapie demeure marginal dans le traitement des cancers du côlon. Elle constitue une option pour le traitement des tumeurs incomplètement réséquées, surtout lorsque le reliquat tumoral est minime et qu'aucune autre attitude thérapeutique potentiellement curatrice ne peut être envisagée [Allee et coll, 1989].

L'ensemble de la chimiothérapie des cancers colorectaux, a été profondément modifié ces dernières années, en particulier en ce qui concerne les traitements métastatiques avec maintenant deux à trois lignes de chimiothérapie active. Le traitement de référence du cancer du côlon adjuvant reste l'association 5FU + acide folinique, éventuellement sur un schéma LV5 FU2, mais les nouvelles drogues telles que l'irinotécan (FOLFIRI), l'oxaliplatine (FOLFOX), cherchent à se frayer une place dans cette indication.

III.A.8. Chimioprévention du cancer colorectal

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Cf infra

Difluorométhylornithine

La D,L-α-difluorométhylornithine est un inhibiteur irréversible de l'ornithine décarboxylase (ODC), enzyme limitante de la synthèse des polyamines, qui sont elles-mêmes essentielles à la viabilité et la croissance des cellules de mammifères [Steglich et Scheffler, 1982]. La perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *APC*, altération génétique fréquente et précoce au cours du processus de cancérogenèse du côlon, est responsable d'une activation de l'oncogène c-*myc*, lui-même entraînant une augmentation de l'activité ODC au niveau intestinal [Su et coll, 1992]. Plusieurs équipes ont montré que la difluorométhylornithine, seule ou en association, est capable de supprimer la formation de tumeurs dans des modèles animaux de cancérogenèse de la peau, du côlon, du sein et de la vessie [Homma et coll, 1985; Nigro et coll, 1986; Thompson et Ronan, 1986; Weeks et coll,

1982]. Des données récentes suggèrent que l'association de la difluorométhylornithine avec l'aspirine ou le piroxicam est supérieure aux molécules seules [Jacoby et coll, 2000a; Li et coll, 1999; Reddy et coll, 1990]. Des essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité de l'association difluorométhylornithine et sulindac ou célécoxib [Gwyn et Sinicrope, 2002].

Les inhibiteurs de l'HMGCoA réductase

Dans un modèle murin de cancer colique, il a été montré que la pravastatine et la simvastatine réduisent significativement le nombre de tumeurs [Narisawa et coll, 1994]. Dans une autre étude chez le rat, l'administration de pravastatine est associée à une réduction de l'incidence de cancer colique [Narisawa et coll, 1996]. Enfin, dans un modèle de carcinogenèse chimique, l'association, mais pas les molécules isolément, de lovastatine et de sulindac entraîne une diminution du nombre de focus de cryptes aberrantes [Agarwal et coll, 1999].

L'acide ursodésoxycholique

Dans les modèles animaux, une augmentation de l'exposition de l'épithélium colique aux acides biliaires, est responsable d'une augmentation de la prolifération cellulaire et de la formation de tumeurs par les carcinogènes chimiques [Cohen et coll, 1980; Deschner et coll, 1981; Hori et coll, 1998]. Dans des modèles animaux, l'acide ursodésoxycholique réduit de façon significative l'incidence des adénomes coliques et des cancers [Earnest et coll, 1994; Narisawa et coll, 1999].

Autres molécules

La supplémentation du régime alimentaire par le calcium [Potter, 1999] ou par les folates [Giovannucci et coll, 1993] semble associée à une diminution de l'incidence de cancer colorectal chez l'homme. Les effets d'agents antioxydants (vitamines C et E, β-carotène) [Potter, 1999] ou des dérivés du sélénium [Vinceti et coll, 2000] semblent, par contre, moins probants.

III.B. PRINCIPAUX MODELES ANIMAUX DE CANCER COLORECTAL

L'hypothèse que les AINS pourraient réduire l'incidence ou la croissance de tumeurs cancéreuses colorectales a émergé dans le milieu des années 70 quand Bennett et Del Tacca [Bennett et Del Tacca, 1975] et Jaffe [Jaffe, 1974] montrèrent que les concentrations en PGE_2 étaient plus importantes dans les tissus humains de tumeur colorectale que dans la muqueuse normale environnante. Différentes études ont montré que COX-2, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine, était surexprimée dans plusieurs types de tissus humains néoplasiques (tractus digestif, sein, poumon, foie, peau, pancréas, tumeurs ORL) suggérant que cette isoforme joue un rôle significatif dans le processus de carcinogenèse [Fosslien, 2000], notamment au cours de la

transformation de l'adénome colique en carcinome. Des travaux récents ont montré qu'il existe également une expression accrue de COX-2 au niveau des cellules interstitielles, de type macrophage, des adénomes coliques [Ota et coll, 2002].
Les constatations précédentes incitèrent plus d'une quarantaine d'études chez l'animal [Thun et coll, 2002].

Ces modèles présentent de nombreux intérêts :

- tenir compte de tous les types cellulaires du tissu tumoral,
- utiliser des doses pertinentes d'un point de vue pharmacologique,
- s'affranchir de facteurs confondants dans les études épidémiologiques, comme l'environnement ou le style de vie,
- optimiser la chimioprévention en fonction des stades de développement des lésions.

Il est possible de distinguer plusieurs modèles de cancer colorectal.

- *Tumeurs induites par des carcinogènes chimiques*

Dans ces modèles, des rats nouveaux-nés ou des souris reçoivent par voie sous-cutanée de l'azoxyméthane ou d'autres carcinogènes connus pour leur pouvoir inducteur de cancer intestinal, puis des concentrations déterminées d'AINS sont incorporées dans la nourriture ou l'eau de boisson. Ces études varient essentiellement selon l'initiation du traitement par AINS par rapport à l'exposition au carcinogène : traitement avant exposition au carcinogène (phase d'initiation), pendant la phase de promotion-progression, ou les deux.
Les deux principaux inducteurs chimiques sont :
- diméthylhydrazine : 12 mg/kg par voie sous-cutanée (S.C.) 1 fois par semaine
- azoxyméthane (AOM) : 15 mg/kg S.C. 1 fois par semaine : 52 semaines après traitement par AOM, il y a apparition chez 80% des animaux de tumeurs coliques de type "aberrant crypt foci" (ACF) qui correspondent à des lésions prénéoplasiques présentant des mutations sur le gène *Apc* et l'oncogène *ras*.
L'aspirine, les autres AINS classiques (piroxicam, indométacine, sulindac, ibuprofène, kétoprofène) et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 inhibent la carcinogenèse induite chimiquement chez les rats et les souris. Les doses maximales tolérées des AINS non sélectifs réduisent habituellement le nombre et la taille des tumeurs de l'ordre de 40 à 60%.

Trois points importants se dégagent de ces études :

① Les AINS non sélectifs suppriment la croissance tumorale d'une façon plus importante et à de plus faibles doses si le traitement est commencé avant ou pendant l'exposition au carcinogène, que si le traitement est retardé jusqu'à la phase de promotion-progression tumorale.

② Les AINS, sélectifs ou non, inhibent les stades précoces du développement tumoral, mais seuls les inhibiteurs sélectifs de COX-2 sont efficaces si le traitement est retardé [Reddy et coll, 2000].

③ Le traitement par AINS doit être poursuivi sans interruption pour éviter toute résurgence de la croissance tumorale [Thun et coll, 2002].

Ces modèles chimiques montrent néanmoins certaines limites :

- le carcinome se développe après dysplasie, plutôt qu'à partir d'un adénome
- de fortes doses d'agent carcinogène sont requises, ce qui constitue une différence avec les conditions d'exposition chez l'homme
- ils ne rendent pas compte des cas de cancer issus d'anomalies génétiques (ex : FAP)

- Modèles de polypose familiale (FAP : Familial Adenomatous Polyposis)

Plusieurs modèles murins ont été développés pour déterminer les effets d'AINS sélectifs ou non sur l'apparition d'adénomes intestinaux. Ces modèles reproduisent le rapide développement de polypes adénomateux qui atteint les personnes ayant une inactivation d'origine germinale d'un des gènes *APC*.

On distingue :

- les souris Min (Multiple Intestinal Neoplasia), femelles hétérozygotes présentant une mutation stable au niveau du gène *APC*, induite initialement par l'éthylnitrosourée, avec apparition d'adénomes dans l'intestin grêle
- les souris $APC^{\Delta 716}$ dont le gène *APC* est partiellement délété par mutagenèse dirigée

Dans ces modèles, des AINS non sélectifs (sulindac [Boolbol et coll, 1996], aspirine [Mahmoud et coll, 1998], piroxicam) et des AINS sélectifs de COX-2 (célécoxib [Jacoby et coll, 2000b], rofécoxib [Oshima et coll, 2001]) entraînent une nette réduction du nombre de polypes et de leur volume.

Les principales limites des modèles FAP résident dans la différence de topographie des lésions : intestin grêle pour les modèles animaux, colon et éventuellement duodénum chez l'homme.

- Modèle de xénogreffe sur la souris Nude

Dans ces essais, des cellules de cancer colorectal en culture sont xénogreffées au niveau des flancs de souris Nude (sans thymus), et le volume tumoral est mesuré au cours du temps en réponse à différents traitements.

Tableau V : Effets du piroxicam sur des tumeurs induites par des carcinogènes chimiques

Agent d'initiation de cancer colique	Administration du piroxicam			Effets	
	Voie	Dose	Fréquence et durée	Rapport de l'incidence dans le groupe piroxicam par rapport aux contrôles	Nombre de tumeurs par rat porteur de tumeur
MAM	Nourriture	8-8,25 mg/kg 2 x/semaine 12,5 mg/kg 2x/semaine	7 jours après traitement avec MAM jusqu'à 20 semaines	0,22-0,71 0,38	Réduit de 1,9-3,3 à 0,2-0,8 Réduit de 2,1 à 0,4
MNU	Nourriture	8 mg/kg 2x/semaine	7 jours après traitement avec MNU pendant 20 semaines	0,33-0,50	Réduit de 3,8-6,7 à 0,3-0,9
AOM pendant 8 semaines	Nourriture	3,3 mg/kg 2x/semaine 7,0 mg/kg 2x/semaine	D'une semaine avant la 1ère dose d'AOM jusqu'au sacrifice à 26 semaines	0,99 (grosses tumeurs) 0,86 (grosses tumeurs)	Pas d'effet Réduit de 3,4 à 2,3
AOM à 7-8 semaines	Nourriture	25-150 ppm	D'une semaine avant le traitement par AOM jusqu'à 40 semaines De 13 semaines après le traitement par AOM jusqu'à 40 semaines	0,44*-0,69*, diminuant avec la dose 0,37*-0,78*, diminuant avec la dose	Dose-dépendante de 2,7 à 1,2 aux plus hautes doses Pas de dose-dépendance De 2,7 à 1,6-1,8
AOM à 7-8 semaines	Nourriture	25-150 ppm	D'une semaine avant le traitement par AOM jusqu'à 56 semaines	Réduction de l'incidence des adénocarcinomes mais pas des adénomes	Réduction des adénocarcinomes, pas des adénomes
AOM à 7-8 semaines	Nourriture	40% DMT 80% DMT	D'une semaine avant le traitement par AOM jusqu'à 52 semaines	0,50*** 0,34***	Réduit de 1,8 à 0,5 Réduit de 1,8 à 0,5
AOM à 7-8 semaines	Nourriture	40% DMT (200 ppm) 80% DMT (400 ppm)	D'une semaine avant le traitement par AOM jusqu'à 60 semaines	0,55* 0,36**	Réduit de 1,0 à 0,5 Réduit de 1,0 à 0,4
AOM à 7-11 semaines	Nourriture	150 ppm	D'une semaine avant le traitement par AOM jusqu'à un certain nombre de semaines : 0 4 16 24 32	 0/0 0,5 0,2 0,6	 - Pas d'effet Réduit de 2,7 à 1,5 Réduit de 3,5 à 1,4

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

MAM methylazoxymethanol acetate MNU *N*-methyl-*N*-nitrosurea AOM azoxymethane DMT Dose Maximale Tolérée

Des effets similaires au piroxicam ont été rapportés pour l'indométacine (20 mg/l dans l'eau de boisson; 0,25 mg/kg *per os*; 2,5 mg/kg 3 fois/semaine I.P.; 7,5 mg/kg par voie rectale), le kétoprofène (100-200 ppm dans l'eau de boisson), le sulindac (5 mg/kg dans l'eau de boisson) et l'aspirine (200-400 ppm dans l'eau de boisson) [Reddy et coll, 1993].

Tableau VI : Effets des AINS dans des modèles animaux de cancer colorectal

REFERENCE	DESCRIPTION DE L'ETUDE	RESULTATS
Kudo et coll.	Rats Donryu/MAM/indométacine	Incidence et charge tumorales inférieures chez les rats traités
Narisawa et coll.	Rats CD-Fischer/MNU/indométacine	Réduction significative de l'incidence et de la charge tumorales chez les rats traités
Pollard et coll.	Rats Sprague-Dawley/DMH+MAM/indométacine	Réduction significative du nombre et de la taille des tumeurs chez les rats traités par indométacine
Craven et coll.	Rats Sprague-Dawley /indométacine ou aspirine / H^3-thymidine incorporation	Inhibition de la synthèse de prostaglandin E
Pollard et Luckert	Rats Sprague-Dawley/MAM/piroxicam	Réduction significative du nombre de rats porteurs de tumeurs et du nombre de tumeurs par rat
Narisawa et coll.	Rats CD-Fischer/MNU/indométacine	Réduction significative de la masse tumorale
DeRubertis et coll.	Rats Sprague-Dawley /indométacine/aspirine	Augmentation de l'ornithine décarboxylase dans le colon et diminution de la synthèse de prostaglandine
Nigro et coll.	Rats Sprague-Dawley/DFMO/piroxicam	Nombre de tumeurs significativement réduit
Reddy et coll.	Rats F344/azoxymethane/piroxicam	80-84% d'inhibition tumorale, incidence tumorale diminuée, effet dose-réponse
Moorghen et coll.	Souris/DMH/sulindac	Réduction de la fréquence et de l'incidence des tumeurs lors d'une co-administration avec le carcinogène
Carter et coll.	Rats Sprague-Dawley/DMBA/indométacine et carprofène	Réduction du cancer du sein, seulement chez les animaux avec un régime riche en graisses
Reddy et coll.	Rats F344/azoxymethane et DFMO/piroxicam	Réduction significative de la charge et de l'incidence tumorales, effet dose-réponse, risque relatif de 0,23
Rao et coll.	Rats F344/azoxymethane/piroxicam	Moins de tumeurs et incidence diminuée
Skinner et coll.	Rats Sprague-Dawley/DMH/sulindac	Moins de tumeurs et taux de croissance diminué, résultant en des tumeurs plus petites
Reddy et coll.	Rats F344/azoxymethane/piroxicam/ibuprofène	Inhibition dose-dépendante avec le piroxicam
Reddy et coll.	Rats F344/azoxymethane/aspirine	Réduction significative de l'incidence tumorale et du nombre de tumeurs
Pereira et coll.	Rats F344/azoxymethane/piroxicam, sulindac, calcium	Réduction des tumeurs de type "aberrant foci" au niveau des muqueuses coliques
Jacoby et coll.	Modèle souris Apc^{min}/piroxicam à différentes doses/6 semaines de traitement	Réduction dose-dépendante du nombre de tumeurs

MAM methylazoxymethanol MNU methylnitrosourea DMH dimethylhydrazine DFMO difluoromethylornithine

DMBA dimethylbenzanthracene

III.C. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES ET CLINIQUES

III.C.1. Polyposes (adénome)

a) Polypose Familiale (FAP)

Cette maladie héréditaire à transmission autosomique dominante a suscité de nombreuses études à ce jour. Sa principale caractéristique est le développement, dès le plus jeune âge, de polypes adénomateux dans le tractus digestif (colon+++, duodénum+) avec l'apparition précoce d'un cancer au cours de la 3ème ou 4ème décade de la vie, phénomène lié à une inactivation germinale d'un des allèles du gène *APC*. La polypose familiale est responsable de moins de 1% des carcinomes colorectaux détectés dans la population générale. Cependant, cette maladie reste un modèle de choix d'inactivation d'*APC* en raison des mutations somatiques sur le gène *APC* qui apparaissent précocement dans 85% des cancers se développant à partir de polypes adénomateux sporadiques.
Actuellement, le traitement de référence de la polypose familiale reste la colectomie. Le principal AINS étudié a été le sulindac à la posologie de 300-400 mg par jour : on observe une nette réduction du nombre de polypes et de leur volume, avec rétablissement d'un niveau d'apoptose normal dans les colonocytes [Pasricha et coll, 1995; Spagnesi et coll, 1994]. Cet effet est néanmoins limité à la durée du traitement car il y a réapparition des lésions à l'arrêt. Il faut également noter que quelques cas de cancer du rectum ont été décrits chez des patients recevant du sulindac [Lynch et coll, 1995].
Plus récemment, des résultats encourageants ont été obtenus avec le célécoxib, à la dose de 400 mg 2 fois par jour pendant 6 mois : une réduction de 31% (par rapport au placebo) du nombre et de la taille des polypes a été observée chez des patients atteints de polypose familiale [Steinbach et coll, 2000].

b) Polypose sporadique ("sporadic adenomatous polyps")

Il faut souligner la rareté des études (n=2), avec des échantillons de petite taille ou des critères d'inclusion imprécis. Dans ce cas, le sulindac à la posologie de 150mg x2 par jour, n'a pas eu d'effet net en terme de réduction du nombre de polypes.
Les limites d'interprétation de ces études résident dans la recherche de la disparition des polypes sur le colon gauche, alors que les effets des AINS se sont avérés plus nets sur le colon droit dans les modèles expérimentaux (AOM).

III.C.2. Cancer colorectal (adénocarcinome)

La première mise en évidence épidémiologique d'un rôle des AINS dans cette pathologie date de 1991 avec la Cancer Prevention Study II (CPS-II), au cours de laquelle une réduction de 40% du risque de cancer colorectal mortel est montrée chez les personnes prenant de l'aspirine 16 fois ou plus par mois par rapport à celles qui n'en prennent pas [Giovannucci et coll, 1995b; Giovannucci et coll, 1994a; 1992; Thun et coll, 1991a].

Parmi toutes les études existantes (Figure 14), on distingue :

a) Etudes rétrospectives cas-témoins

Ces études ont essentiellement concerné l'aspirine, l'indométacine, le naproxène, le diclofénac, l'ibuprofène, et le sulindac. Il a pu être mis en évidence un effet protecteur des AINS dans le cas d'une utilisation régulière (plusieurs fois par semaine) et d'un traitement prolongé (plusieurs années). Par contre, les doses thérapeutiques à utiliser restent imprécises.
Comme dans les modèles animaux précédemment décrits, il s'agit d'un effet préventif [Little et coll, 1994]. Dans ces études, le paracétamol n'a eu aucun effet.
Ces études présentent un certain nombre de limites d'interprétation liées au recueil des données (rétrospectif, questionnaires) et à l'hétérogénéité des échantillons.

b) Etudes prospectives

Ces études ont principalement porté sur l'aspirine. Un effet préventif des AINS a pu être mis en évidence sur la mortalité par cancer colorectal, sur l'incidence du cancer colorectal et sur la récurrence des polypes.
Là encore, des limites d'interprétation existent : un biais de sélection des patients (niveau socioéconomique, hygiène de vie) est possible. De même, les effets indésirables gastrointestinaux (saignements) ont pu jouer sur le dépistage des lésions cancéreuses. Enfin, ces études sont de durée variable, avec parfois un arrêt prématuré [Gann et coll, 1993].

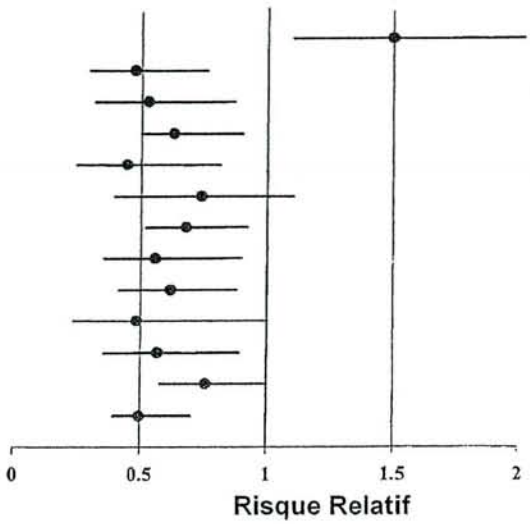
c) Essais randomisés

Une vingtaine d'essais cliniques randomisés ont été mis en place pour déterminer si les AINS non sélectifs ou les coxibs peuvent inhiber le développement précoce de cancer colorectal. La plupart sont des essais étudiant les effets des AINS sur la muqueuse rectale, ainsi que leur toxicité gastrique [Calaluce et coll, 2000; Carbone et coll, 1998; Chow et coll, 2000; Ruffin et coll, 1997].

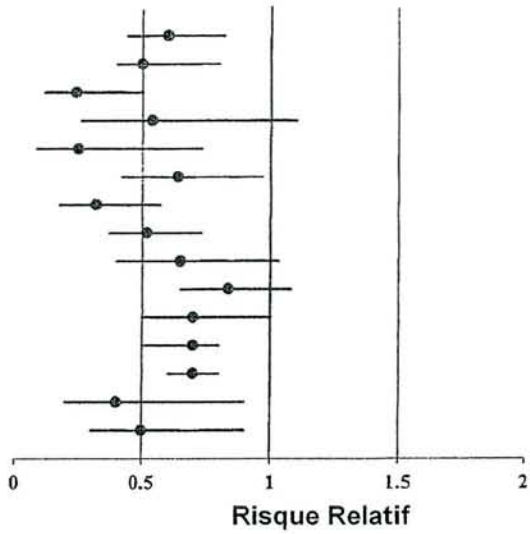
Sept essais de phase III testent l'aspirine, d'autres AINS non sélectifs et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans la suppression du développement de polypes adénomateux ou de cancer chez des patients à haut risque. Ces essais de chimioprévention fourniront les premières données randomisées sur l'efficacité de l'aspirine (80 à 300 mg par jour) ou du célécoxib (200 à 400 mg par jour) dans l'inhibition du développement de polypes adénomateux sporadiques chez des patients sans polypose familiale. Deux de ces études étudient également les effets de l'aspirine et du célécoxib chez les patients atteints de HNPCC[4], une caractéristique rendant compte d'environ 15% des cancers colorectaux. L'essai APPROVe avec le rofécoxib a récemment été interrompu en raison des effets indésirables cardiovasculaires de cette molécule [Topol, 2004].

[4] hereditary nonpolyposis colon cancer

A
[Paganini-Hill et coll, 1989]
[Thun et coll, 1991b] hommes
[Thun et coll, 1991b] femmes
[Gridley et coll, 1993]
[Pinczowski et coll, 1994]
[Schreinemachers et Everson, 1994]
[Giovannucci et coll, 1994b]
[Giovannucci et coll, 1995a]
[Kauppi et coll, 1996]
[Smalley et coll, 1999]
[Collet et coll, 1999]
[Langman et coll, 2000]
[Garcia-Rodriguez et Huerta-Alvarez, 2001]



B
[Kune et coll, 1988]
[Rosenberg et coll, 1991]
[Suh et coll, 1993] hommes
[Suh et coll, 1993] femmes
[Peleg, 1994
[Muscat, 1994] hommes
[Muscat et coll, 1994] femmes
[Muller et coll, 1994]
[Reeves et coll, 1996]
[Bansal et Sonnenberg, 1996]
[La Vecchia et coll, 1997]
[Rosenberg et coll, 1998]
[Friedman et coll, 1998]
[Coogan et coll, 2000]
[Coogan et coll, 2000]



C
Etudes prospectives
[Greenberg et coll, 1993]
[Giovannucci et coll, 1994b]
[Garcia Rodriguez et Huerta-Alvarez, 2000] (sauf aspirine)
[Garcia Rodriguez et Huerta-Alvarez, 2000] (aspirine)

Etudes rétrospectives
[Logan et coll, 1993]
[Suh et coll, 1993]
[Martinez et coll, 1995]
[Peleg et coll, 1996]
[Sandler et coll, 1998]
[Breuer-Katschinski et coll, 2000]

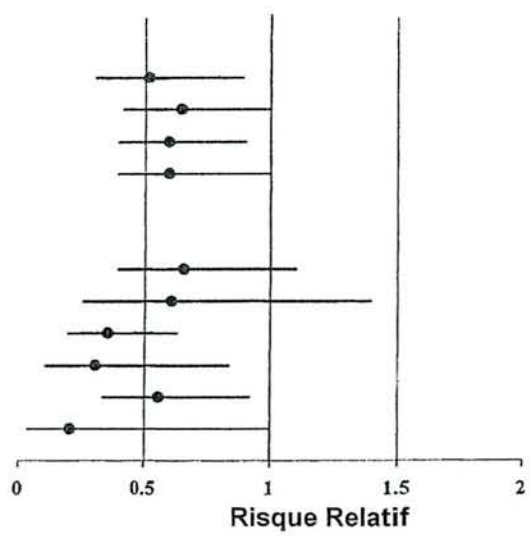


Figure 14 : Etudes épidémiologiques de l'association entre AINS et cancer colorectal ou polypes adénomateux
A. Etudes de cohorte **B.** Etudes cas-contrôles AINS et cancer colorectal **C.** Etudes entre AINS et polypes d'après [Thun et coll, 2002]

III.D. BASES PHYSIOPATHOLOGIQUES DU ROLE DES PROSTAGLANDINES DANS LE CANCER COLORECTAL

Dans les modèles animaux, par rapport aux zones saines, on observe au niveau des lésions (ACF) présentes chez les rats AOM, une expression accrue de COX-2. De la même façon, dans les polypes apparaissant chez les souris *Min* et $APC^{\Delta 716}$, il existe une expression accrue de COX-2 ainsi qu'une augmentation de la synthèse de PGE_2.

Au niveau des tissus tumoraux, on observe une augmentation du contenu en acide arachidonique, peut-être *via* une augmentation de l'activité de la phospholipase A_2, mais également une production accrue de prostaglandines, E_2 et $F_2\alpha$ principalement [Pugh et Thomas, 1994]. Cet acide arachidonique pourrait activer la conversion de la sphingomyéline en céramide, inducteur de l'apoptose [Chan et coll, 1998].

Les prostaglandines peuvent quant à elles participer à la carcinogenèse à plusieurs niveaux et exercent un rôle promoteur de tumeur par :

- leur capacité de stimuler la prolifération des cellules colorectales [Qiao et coll, 1995];
- leur capacité de moduler la réponse immunitaire, dans le sens d'une immuno-suppression
- leur effet permissif vis-à-vis de certains mitogènes (EGF, IGF) (mais pas le PDGF) ;
- leur rôle dans la néovascularisation et la formation de métastases (PGI_2, TXA_2, principalement).

En termes de cyclo-oxygénases, COX-1 et 2 sont faiblement exprimées au niveau du tissu colique sain normal, hormis une expression de COX-2 circonscrite à quelques cellules inflammatoires (lymphocytes, macrophages). Au stade des polypes, il n'y a pas de modification de l'expression des cyclo-oxygénases. Dans les tumeurs, l'expression de COX-1 reste stable ou diminue, alors que celle de COX-2 apparaît ou augmente de façon significative, sans toutefois dépasser celle de COX-1 (à la fois au niveau des protéines et de leur messagers) [Eberhart et coll, 1994].

Ces modifications de l'expression des cyclo-oxygénases pourraient exister à un stade précoce de la progression vers une tumeur et prédisposeraient les cellules concernées à devenir tumorales (Figure 15). En effet l'expression accrue des cyclo-oxygénases interviendrait dans la tumorigenèse

via la synthèse de prostaglandines potentiellement mitogéniques, mais également par biotransformation et activation de carcinogènes (oxydation d'amines aromatiques et hydrocarbures polycycliques : benzidine par exemple) ou la formation de malondialdéhyde potentiellement mutagène à partir des endoperoxydes cycliques (PGH_2).

Cependant, ces variations d'expression des COXs ne sont pas corrélées avec le stade des tumeurs (classification de Duke). Par ailleurs, il faut souligner que dans les lignées cancéreuses, le rapport ARNm COX-2/COX-1 reste toujours inférieur ou égal à 1.

La surexpression de COX-2 humaine par transfection dans des cellules épithéliales intestinales de rat est associée à une résistance à l'apoptose, notamment celle induite par le butyrate (acide gras issu de la fermentation bactérienne dans l'intestin, des fibres alimentaires, connues pour leur rôle préventif dans le cancer colorectal), et à une modification de l'adhérence des cellules aux constituants de la matrice extracellulaire avec un potentiel métastatique accru, notamment sur milieu extracellulaire synthétique (Matrigel) [Hague et coll, 1993; Tsujii et coll, 1998]. Ces deux phénomènes s'expliquent en partie par une diminution de l'expression membranaire du récepteur au TGFβ (modulant la mort cellulaire programmée) et de la E-cadhérine [Tsuji et DuBois, 1995]. Une augmentation de l'expression de la gélatinase (MMP-2), via l'activation de MT-MMP-1, a été mise en évidence, ainsi qu'une augmentation de la production de facteurs angiotensines. Il a également été observé une augmentation de l'expression de bcl2, inhibiteur de l'apoptose, dans ces cellules. L'ensemble de ces effets semble être corrigés par une incubation des cellules avec du sulindac. De plus, dans un modèle murin de polypose familiale, l'expression intestinale de COX-2 semble liée à la mutation du gène *APC* et COX-2 pourrait jouer le rôle de promoteur de la tumorigenèse [Oshima et coll, 1996].

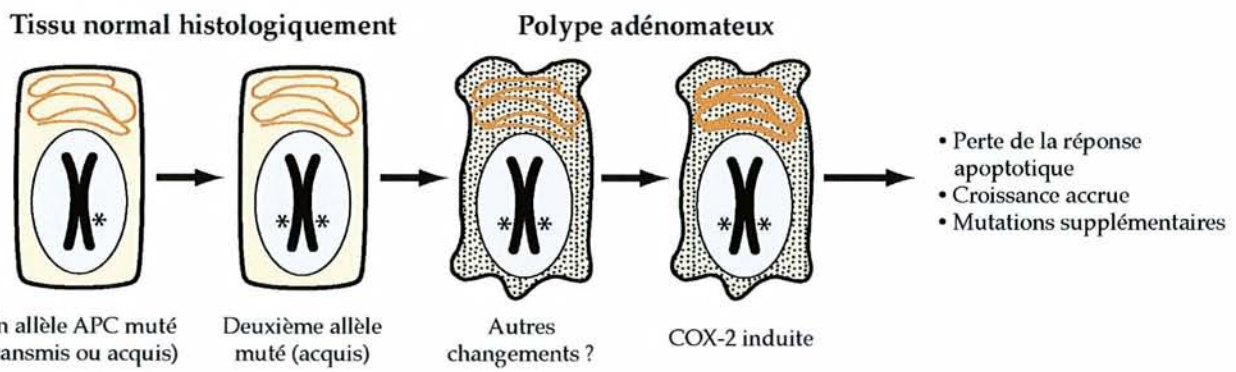


Figure 15 : Rôle de COX-2 comme promoteur de la tumorigenèse [Fearon et Vogelstein, 1990]

Quelques études ont déjà été menées, notamment sur HT29 et Caco-2. Les données actuelles sont contradictoires quant aux mécanismes d'actions des AINS. En effet, certains auteurs observent une modification de la morphologie cellulaire et des effets sur la distribution des cellules dans le cycle : augmentation de la phase G_0/G_1, diminution de la phase S (et parfois de la phase G_2/M) [DuBois et coll, 1996].

Un effet antiprolifératif et une induction d'apoptose ont été rapportés avec certains AINS (indométacine, naproxène, piroxicam). Ces effets varient généralement avec la concentration d'AINS et du temps d'incubation sans proportionnalité directe. L'action antiproliférative existe d'ailleurs à des concentrations inférieures à celles responsables de modifications significatives du cycle cellulaire. L'aspirine, dont l'efficacité est suggérée par les études épidémiologiques, n'induirait pas d'apoptose, tout en ayant un effet sur la prolifération [Hanif et coll, 1996].

Par ailleurs, le rôle que peut jouer la COX-2 dans le cancer colorectal reste à préciser. Les concentrations employées dans certaines études *in vitro* sont élevées, de l'ordre du mM, ce qui n'est pas en faveur d'une sélectivité d'action des différents AINS testés. De plus, les énantiomères *R* et *S* du flurbiprofène auraient les mêmes effets antiprolifératifs sur des colonocytes de rat, ce qui suggère des mécanismes indépendants de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines [Levy, 1997] (Figure 16).

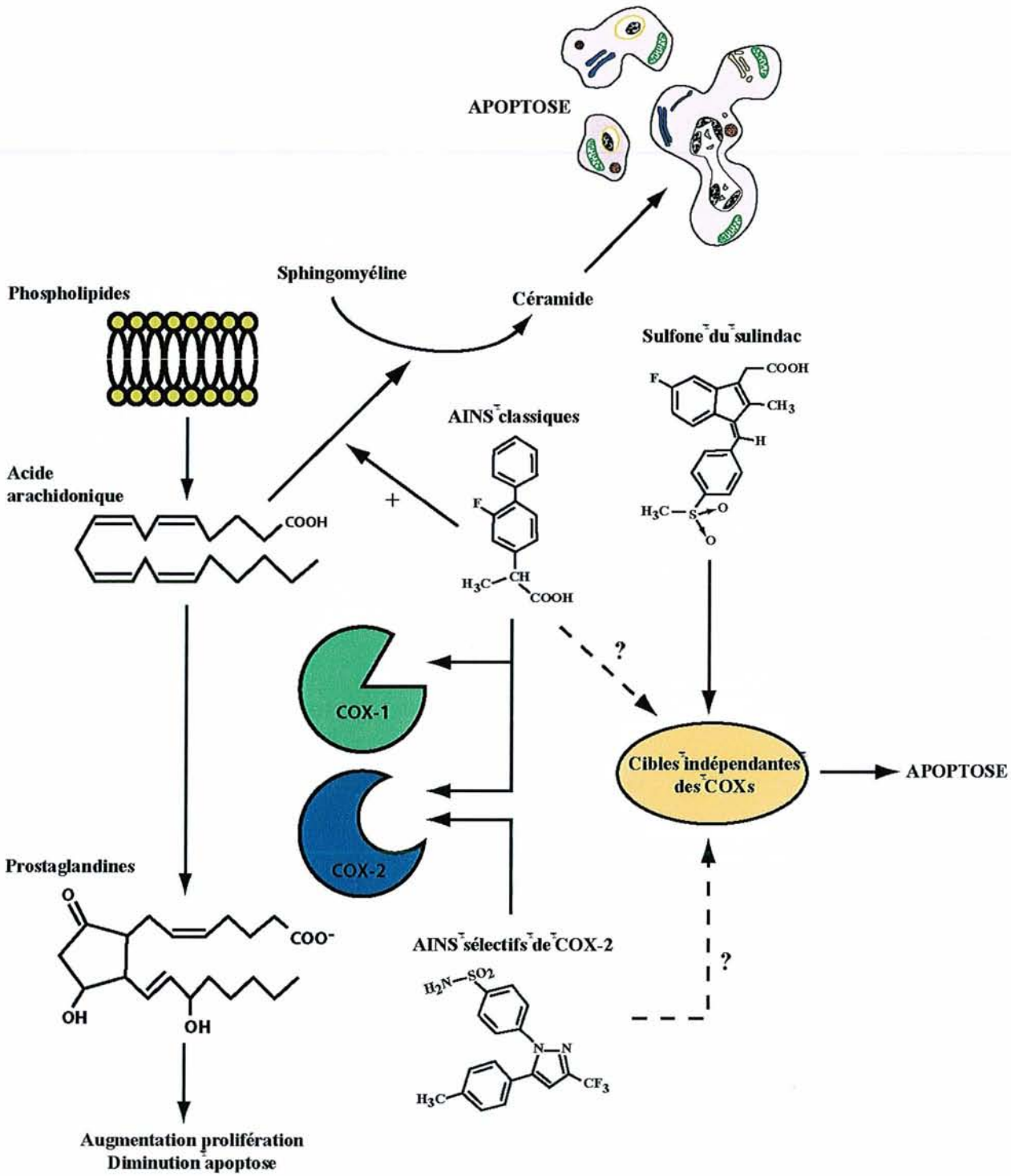


Figure 16 : Mécanismes d'action possibles des AINS

OBJECTIF DU TRAVAIL

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes médicamenteuses les plus prescrites dans le monde en raison de leurs propriétés antipyrétique, antalgique, anti-inflammatoire et anti-agrégante plaquettaire. Depuis les travaux de Vane dans les années 1970-71, le principal mécanisme d'action invoqué pour ces médicaments est l'inhibition de la cyclo-oxygénase, enzyme clé de la biosynthèse des prostaglandines [Vane, 1971]. Des travaux récents permettent de distinguer deux isoenzymes de la cyclo-oxygénase : l'une constitutionnelle (COX-1), exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme, l'autre (COX-2) exprimée physiologiquement dans un nombre restreint de tissus (prostate, cerveau, rein) mais fortement induite dans de nombreux tissus au cours de la réaction inflammatoire. La notion que l'aspirine et les autres AINS pourraient également modifier l'évolution de certains cancers est apparue vers la fin des années 70 quand des concentrations plus importantes de différentes prostaglandines (PG), dont PGE_2, ont pu être mises en évidence dans diverses tumeurs humaines (colon, poumon, sein) par rapport aux tissus sains environnants. Cependant, la recherche dans ce domaine n'a pris son essor que récemment, en particulier depuis la découverte d'une surexpression de la COX-2 au niveau des tumeurs malignes colorectales, alors que sont actuellement développés des inhibiteurs sélectifs de cette isoforme. Ainsi, même si le mécanisme des AINS dans ce domaine pourrait impliquer des mécanismes indépendants des prostaglandines, l'inhibition de la COX-2 semble être un élément essentiel, qui permettrait entre autre, d'envisager une chimioprévention du cancer colorectal par des AINS sélectifs de la COX-2, en raison de leur tolérance digestive accrue. En effet, même si certains auteurs ont suggéré de consommer régulièrement de l'aspirine pour prévenir le développement du cancer colorectal, cette recommandation ne semble pas raisonnable actuellement du fait du risque important de complications digestives qui apparaît dès les posologies antithrombotiques.

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de différents AINS, sélectifs ou non de la COX-2, sur quatre lignées cellulaires humaines de cancer colorectal. Après avoir étudié l'expression des cyclo-oxygénases dans nos conditions expérimentales, nous présenterons nos résultats en terme de :

- prolifération, viabilité, métabolisme et différenciation cellulaires ;
- effets sur le cycle cellulaire ;
- apoptose ou mort cellulaire programmée, aux stades précoces (modifications membranaires, activation des caspases) et tardifs (modifications nucléaires)
- effets sur la mitochondrie.

ETUDE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES

I.A. LIGNEES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE

Quatre lignées dérivant de cancers colorectaux humains (adénocarcinome de colon) ont été utilisées au cours de ce travail : HCT15, HCT116, HT29 et Caco-2. Ces lignées ont été obtenues auprès de la Collection Européenne de Cultures de Cellules Animales (ECACC, Cerdic, Sophia-Antipolis, France), sous les références respectives : 91030712, 91091005, 91072201 et 86010202.

Ces lignées sont entretenues en culture monocouche dans des flacons de 75 cm^2 (Costar, D. Dutcher, Brumath, France), et maintenues à 37°C, sous une atmosphère humide enrichie à 5% de CO_2.

Le milieu de culture utilisé est du milieu de Dulbecco modifié par Eagle (DMEM)/ Ham F12 supplémenté par 5% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (Dutscher D., France), de la glutamine (4 mM), de la pénicilline (100 U/ml), de la streptomycine (100 µg/ml) et de l'amphotéricine B (0,5 µg/ml). Tous les produits proviennent de Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

I.B. REACTIFS ET SUBSTANCES CHIMIQUES TESTEES

I.B.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

- Acide acétylsalicylique (Sigma, France)
- Célécoxib ou SC58635 (Searle-Pharmacia, Paris, France)
- Indométacine (Sigma)
- Kétoprofène sous forme racémique (Sigma)
- NS-398 (Biomol, Plymouth, Royaume-Uni)
- Sulfure de sulindac (Merck, Sharp and Dohme, Rahway, Etats-Unis)

I.B.2. Autres réactifs

- DMSO (diméthyl sulfoxide, Sigma)
- PBS (tampon phosphate équilibré en sel, Invitrogen)
- Sel de tétrazolium (MTT) (Sigma)
- Iodure de propidium (Sigma)

- Sytox green (Molecular Probes, Pays-Bas)
- JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazol-carbocyanine iodide) (Molecular Probes)
- FCCP (carbonyl cyanide *p*-trifluorométhoxyphényl hydrazone) (Sigma)
- mClCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophényl hydrazone) (Sigma)
- Ciclosporine A (Sigma)

I.B.3. Anticorps pour Western Blot

- Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre COX-1, COX-2 et la β-actine (Santa Cruz, distribué par Tébu, France)
- Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la forme mature de Smac/DIABLO (Calbiochem, distribué par France Biochem, France)
- Anticorps monoclonal de souris anti-cytochrome *c* (Biomol, distribué par Tébu)

I.C. ETUDE DU METABOLISME CELLULAIRE

Les cultures sont réalisées dans des plaques stériles 24 puits. Environ 10000 cellules sont déposées dans chaque puits sous un volume de 1 ml. Après 72 heures d'incubation (J3), le milieu est remplacé par du milieu complet (DMEM/HamF12, 5% SVF) contenant 0,5% (v/v) de DMSO ou par du milieu complet contenant de 10^{-8}M à 10^{-3}M d'AINS sous une concentration finale de 0,5% (v/v) de DMSO. L'activité des déshydrogénases mitochondriales est évaluée quotidiennement.

Le protocole utilisé a été adapté de celui de Hansen [Hansen et coll, 1989]. Dans chaque puit, 600 µl de milieu complet à 5% (v/v) de SVF sont déposés avec 150 µl d'une solution à 5 mg/ml de MTT dans du PBS, afin d'obtenir une concentration finale en MTT de 1 mg/ml. Après 3 heures d'incubation à 37°C sous 5% de CO_2, 600 µl de tampon de lyse solution à 20% (p/v) de Dodécyl Sulfate de Sodium (Sigma) dans du N,N-diméthyl formamide (Sigma) dilué au 1/2 dans l'eau distillée, pH ajusté à 4,7. Après 12 heures d'incubation à 37°C, 225 µl de mélange réactionnel sont transférés dans une plaque 96 puits et la densité optique est lue à 580 nm *versus* 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques Dynatech MR5000 piloté par un microordinateur (Packard Bell) sous le logiciel MRS (Dynatech, Guyancourt, France).

I.D. ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE

Les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, avec un dépôt initial de 50000 cellules. Les puits sont trypsinisés chaque jour de J4 (24 h après ajout d'AINS) à J6 (72 h après ajout d'AINS) et les suspensions cellulaires obtenues sont comptées à l'aide d'un hémacytomètre.

Les mesures sont effectuées en triple et les résultats correspondent à 3 expériences différentes.

I.E. ETUDE DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE

Les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, avec un dépôt initial de 50000 cellules.

L'activité phosphatasique alcaline (PAL) a été choisie comme marqueur de la différenciation entérocytaire. L'activité a été mesurée sur les tapis cellulaires lysés par 300 µl de Triton 0,5% (v/v). Le protocole utilisé (Sigma, n°104) repose sur l'hydrolyse du *p*-nitrophényl phosphate par la PAL en milieu alcalin, avec formation de *p*-nitrophénol qui est mesuré à 410 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-1601 (Roucaire, France).

Les résultats sont exprimés en unités internationales d'activité PAL par mg de protéines. Ces dernières sont dosées à l'aide d'un coffret réactif basé sur la méthode de Smith à l'acide bicinchoninique (Sigma B-9643). Cette méthode fait appel au pouvoir réducteur des protéines sur les sels de cuivre en milieu alcalin (transformation de $Cu_{(II)}$ en $Cu_{(I)}$) et à l'affinité de l'acide bicinchoninique pour les ions cuivreux. Cette méthode n'est pas sujette aux interférences par les détergents. La gamme d'étalonnage entre 0,2 à 1 mg/ml est préparée à partir d'une solution de sérum albumine bovine à 1 mg/ml. Le complexe coloré violet est lu à 562 nm après une incubation de 30 minutes à 37°C, à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu UV-1601.

I.F. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE COX-1 ET COX-2

Les cellules sont cultivées comme décrit précédemment, dans des flacons de culture de 25 cm^2. Après rinçage avec du PBS froid, les cellules sont incubées pendant 30 minutes sur la glace avec une solution tampon (Tris 10 mM pH 7,4 – Triton 1%) mélangée à un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics, France). Les extraits cellulaires totaux sont centrifugés (17000 g, 10 min, 4°C) et les surnageants sont conservés à –20°C jusqu'à utilisation.

La concentration en protéines des surnageants est déterminée par la méthode de Bradford. Des quantités équivalentes de protéines (25 µg/puits) sont mélangées au Gel Loading Buffer (Tris 50 mM, SDS 10%, glycérol 10%, 2-mercaptoéthanol 10%, bleu de bromophénol 2 mg) dans une proportion de 1/1 (v/v), portées à ébullition pendant 3 minutes, puis déposées sur un gel d'électrophorèse de SDS-polyacrylamide 10%. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (Millipore, France) dont la saturation est effectuée par une incubation d'une heure à température ambiante avec un tampon salin Tris-Tween contenant 3% d'albumine bovine sérique (Sigma). La membrane est incubée toute la nuit à 4°C avec une dilution au 1/500^e de l'anticorps primaire anti-COX-1, au 1/250^e de l'anticorps anti-COX-2 et au 1/400^e de l'anticorps anti β-actine, puis rincée 3 fois avec le tampon salin Tris-Tween et incubée pendant 2 heures avec une dilution au 1/20000^e de l'anticorps secondaire d'âne anti-lapin couplé à la peroxydase (Interchim, France). Les immunocomplexes sont enfin révélés par électrochimiluminescence (BM Chemiluminescence Western Blotting Kit, Roche Diagnostics) sur un film photographique (Kodak, France).

I.G. ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE

Les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, avec un dépôt initial de 50000 cellules.

La distribution des cellules dans le cycle cellulaire est déterminée en fonction du contenu cellulaire en ADN, après marquage à l'iodure de propidium (IP) [Krishan, 1975]. Les cellules en suspension et les cellules trypsinisées sont poolées et rincées deux fois au PBS. Les cellules sont marquées par une solution d'iodure de propidium (IP 50 µg/ml, citrate de sodium 0,1%, Triton X100 0,1% v/v). La suspension cellulaire est incubée 48h à 4°C puis centrifugée 5 minutes à 200 g. Le culot est resuspendu dans 200 µl de PBS et incubé avec 250 ng de RNase A (Sigma). Le contenu total en ADN par cellule est quantifié par fluorescence à 585 nm par un cytomètre de flux (Coulter's Epic 752). Les données sont exprimées en pourcentage des populations en phase G_0/G_1 et S, en partant du principe que la population G_2/M est complémentaire des précédentes à hauteur de 100%.

I.H. ETUDE DE L'APOPTOSE

Pour les techniques utilisant la cytométrie en flux, les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, avec un dépôt initial de 50000 cellules. Les cellules sont ensuite trypsinisées et les suspensions cellulaires obtenues traitées selon les différents protocoles.

Pour les techniques d'immunocytochimie, les cultures sont réalisées sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre, trempées dans de l'alcool à 70°, stérilisées à la flamme et placées dans des plaques stériles de 24 puits, avec un dépôt initial de 50000 cellules. Les cellules sont fixées par du paraformaldéhyde à 4% (v/v) dans du PBS (pH 7,4), pendant 20 minutes.

I.H.1. Détection du pic subG1

Cette méthode consiste à fixer et à perméabiliser les cellules pour en extraire les fragments d'ADN et à marquer l'ADN restant avec de l'iodure de propidium (IP).

L'iodure de propidium est un fluorochrome qui s'intercale entre les brins d'ADN et qui fluoresce dans le rouge (585 nm). La fluorescence émise par chaque cellule étant proportionnelle à leur contenu en ADN, celle des cellules en apoptose est donc plus faible que celle des cellules intactes d'où la présence sur l'histogramme d'un pic « subG1 ». Pour les cellules intactes, un pic correspondant aux cellules en phase G_0/G_1 (à 2Q ADN) est visible à une intensité de fluorescence I et un pic correspondant aux cellules en phase G_2/M (à 4Q ADN) à une intensité de fluorescence 2I. La population cellulaire située entre ces deux pics se trouve en phase S du cycle cellulaire. L'analyse des histogrammes permet de déterminer le pourcentage de cellules en $subG_1$.

Les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, avec un dépôt initial de 50000 cellules. Les cellules en suspension et trypsinisées sont poolées, rincées au PBS, puis fixées avec de l'alcool à 95° à froid. Les cellules sont centrigugées (200 g, 5 min), puis resuspendues dans de l'éthanol à 70° et conservées à 4°C pendant 30 min, ou à –20°C jusqu'à analyse.

Les cellules sont enfin rincées 2 fois avec du PBS et marquées par une solution d'iodure de propidium (IP 50 µg/ml EDTA 0,1 mM, Triton X100 0,1% v/v, RNase A 25 µg/ml). Le contenu total en ADN par cellule est quantifié par fluorescence à 585 nm (cytométrie en flux).

I.H.2. Marquage par l'Annexine V

Cette technique permet la mise en évidence de l'apoptose aux stades précoces (kit Annexine V-FITC, Boehringer Ingelheim, France). Les phosphatidylsérines, normalement présentes au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, sont externalisées au début de la mort cellulaire

programmée. Elles sont spécifiquement reconnues par l'annexine V marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine. Les cellules sont contre-colorées à l'iodure de propidium [Fadok et coll, 1992; Koopman et coll, 1994].

Le protocole de marquage pour immunocytochimie est le suivant : après fixation et lavage au PBS, la solution de marquage est déposée sous un volume de 200 µl sur les lamelles, avec une incubation de 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Cette solution contient l'annexine V-FITC (concentration finale 2,5 µg/ml) et l'iodure de propidium (concentration finale 1 µg/ml) dilués dans du tampon Hepes.

Les lames sont photographiées en double exposition sous filtres FITC et rhodamine (microscope Diaphot TMD, Nikon, France).

Le protocole de marquage des cellules pour la cytométrie en flux utilise l'annexine V marquée à la phycoérythrine (Pharmingen) et le Sytox green comme marqueur de l'ADN. Brièvement, les cellules trypsinisées sont resuspendues dans une solution tampon, marquées par 15 µl de Sytox green à 0,25 µM pendant 15 minutes à 4°C. Après centrifugation, le culot est resuspendu dans une solution de fixation (Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M, $CaCl_2$ 2,5 mM, pH 7,4) puis marqué par l'annexine V – PE pendant 15 minutes à 4°C et analysé par cytométrie en flux.

I.H.3. Technique Tunel (TdT mediated digoxigenin-dUTP nick and end labelling)

La technique Tunel (kit Apoptag, Oncor, Appligène, France) permet la détection *in situ* des cellules apoptotiques, à un stade tardif du processus. La fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de la mort cellulaire programmée crée des extrémités 3'-OH qui servent de sites d'incorporation pour des nucléotides conjugués à la digoxigénine, grâce à une enzyme, la TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase). Les nucléotides incorporés sont ensuite mis en évidence par des anticorps anti-digoxigénine marqués à la fluorescéine. Les lamelles sont observées en épifluorescence et photographiées.

Le protocole utilisé est le suivant :

- Fixation, 2 lavages de 5 minutes par du PBS,
- 5 minutes d'incubation en chambre humide, à température ambiante, avec 15 µl de tampon d'équilibration 1X,
- 1 heure d'incubation en chambre humide, à 37°C, avec 12,5 µl de TdT (38 µl de tampon de réaction et 16 µl de TdT par 5 cm^2 d'échantillon),
- Neutralisation par le tampon de lavage, 10 minutes à température ambiante (1 ml de tampon de lavage et 34 ml d'eau distillée),
- 3 lavages de 3 minutes au PBS,
- 30 minutes d'incubation en chambre humide, à température ambiante, avec 15 µl de solution d'anticorps (56 µl de solution de neutralisation et 49 µl d'antidigoxigénine-fluorescéine par 5 cm^2 d'échantillon),

- 3 lavages de 5 minutes au PBS,
- Observation en épi-fluorescence.

Le protocole utilisé pour la cytométrie en flux est adapté du précédent.

I.H.4. Etude de l'activité des caspases 3 et 9

Les cellules sont cultivées comme précédemment en plaques 24 puits avec un dépôt initial de 50000 cellules.

Les tapis cellulaires sont lysés pendant 30 minutes sur de la glace avec un tampon de lyse à pH 7,4 (Hepes 20 mM, sucrose 10%, Chaps 0,1%, DTT 10 mM, PMSF 1 mM, Pepstatine A 10 µg/ml, Leupeptine 10 µg/ml). Après centrifugation des lysats (10 min, 10000 tr/min, 4°C), les surnageants sont incubés pendant 1 heure à 37°C avec un substrat fluorogène (Ac-DEVD aminomethylcoumarin, concentration finale 5 µM) [Euromedex, France]. L'analyse est effectuée avec un spectrofluoromètre (λ_{exc} = 360 nm, λ_{em} = 460 nm). L'activité est normalisée par rapport aux protéines quantifiées par la méthode de Bradford.

I.I. ETUDE DE LA MITOCHONDRIE

I.I.1. Dosage de l'ATP intracellulaire

Les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, avec un dépôt initial de 50000 cellules.

La détermination de l'Adénosine Triphosphate se fait à l'aide du coffret réactif Cytolux ATP Assay Kit (LKB distribué par EEG Instrument) reposant sur une technique de bioluminescence. Après rinçage du tapis cellulaire au PBS et dépôt de 360 µl de ce tampon, l'ATP est extrait par addition de 360 µl d'agent de lyse (Somalyse) qui libère le contenu intracellulaire et neutralise les enzymes consommant l'ATP. La révélation utilise une réaction de bioluminescence de type luciférine/luciférase et la lecture se fait à l'aide d'un luminomètre (modèle 1250-001, LKB Wallac).

I.I.2. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$)

Les modifications du potentiel de membrane sont mesurées à l'aide du colorant JC-1, considéré comme plus performant que le $DiOC_6$ ou la nonyl-acridine orange [Salvioli et coll, 1997]. Pour des faibles valeurs de $\Delta\psi_m$, le JC-1 diffuse à l'intérieur de la cellule sous forme de monomères émettant une fluorescence verte, alors qu'il s'accumule dans la mitochondrie pour former des agrégats

émettant une fluorescence rouge pour des valeurs hautes de $\Delta\psi_m$. Ainsi, les changements de proportions entre monomères et agrégats de JC-1, mesurés par fluorescence, permettent de mettre en évidence les cellules normales et dépolarisées [Smiley et coll, 1991].

Après trypsinisation, environ 10^6 cellules sont incubées pendant 15 minutes à 37°C avec le JC-1 (5 µg/ml, dilué dans du milieu complet à 5% de SVF). Les cellules marquées sont rincées deux fois avec du PBS puis analysées par cytométrie en flux. Les paramètres du photomultiplicateur sont réglés pour mesurer la fluorescence des monomères de JC-1 sur le détecteur du filtre 1 (FL1) (fluorescence verte, centrée à 537 nm) et celle des agrégats sur le détecteur FL2 (fluorescence rouge, centrée à 597 nm). Les valeurs moyennes de l'intensité de fluorescence pour FL1 et FL2 sont exprimées comme « relative linear fluorescence channels » (unités arbitraires allant des canaux 0 à 10^4). Pour chaque expérience, 10000 événements sont analysés. Les données sont exprimées en pourcentage respectif de cellules à $\Delta\psi_m$ élevé (Upper Right) et bas (Low Right), en fonction des valeurs de fluorescence pour les agrégats (rouge) et les monomères (vert) après traitement par les AINS.

Le FCCP (7,5 et 50 µM) est utilisé comme témoin positif de découplage. Dans certaines expériences, pour rechercher la contribution possible du complexe de transition de pore mitochondrial (MPT) dans les changements de potentiel de membrane, la ciclosporine A, inhibiteur du MPT, a été ajoutée à la concentration finale de 1 µM dans le milieu de culture, 1 heure avant l'addition des AINS.

I.I.3. Détection de l'épitope mitochondrial 7A6

Le démasquage de l'épitope mitochondrial 7A6 est un marqueur précoce d'apoptose. Des données récentes suggèrent que son démasquage se fait simultanément à la libération de cytochrome *c* par la mitochondrie [Carthy et coll, 1999]. La détection de l'épitope 7A6 est réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal APO2.7 [Koester et coll, 1997].

Les cellules trypsinisées sont perméabilisées par une solution de digitonine à 100 µg/ml pendant 20 minutes sur la glace. Les cellules sont rincées avec une solution de PBS avec 2,5% de SVF et centrifugées (200 g, 5 min). Les cellules sont ensuite marquées avec 0,3 µg d'anticorps monoclonal APO2.7 conjugué à la phycoérythrine ou par un anticorps isotype contrôle. Après rinçage et centrifugation, les cellules sont reprises dans du PBS avec 2,5% de SVF et conservées à l'obscurité sur la glace, jusqu'à analyse par cytométrie en flux.

I.I.4. Analyse en Western Blot de la libération du cytochrome c et de Smac/DIABLO

Le cytochrome *c* et Smac/DIABLO sont de petites protéines libérées par la mitochondrie dans le cytosol au cours des processus apoptotiques (*cf infra*).

Les cellules sont recueillies par trypsinisation, centrifugées (200 g, 10 min) et rincées 2 fois par du PBS. Après incubation pendant 2 min à 4°C dans un tampon hypotonique (sucrose 250 mM, Tris HCl 10 mM, pH 7,4) mélangé à un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics), les cellules sont lysées à l'aide d'un Dounce avec un piston A. Les homogénats sont centrifugés (14000 g, 15 min, 4°C), et les surnageants centrifugés à nouveau (60000 g, 60 min, 4°C) avant analyse par Western Blot. Les extraits protéiques (25 µg) sont soumis à une électrophorèse sur un gel de SDS-polyacrylamide 15%, puis à un immunotransfert avant incubation des membranes toute la nuit à 4°C avec une dilution au 1/200^{e} de l'anticorps primaire anti-cytochrome *c*, au 1/1500^{e} de l'anticorps anti-Smac/DIABLO ou au 1/500^{e} de l'anticorps anti-β-actine. Les immunocomplexes sont enfin révélés par électrochimiluminescence (Phototope-HRP Western Blot Detection System, Ozyme, France) sur un film photographique (Kodak).

I.J. ETUDE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés sous la forme moyenne ± écart-type, par comparaison au contrôle. Chaque moyenne est calculée à partir de 3 points. La comparaison entre les différentes doses d'AINS pour une lignée donnée a été effectuée par une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test de Scheffe. Le seuil de significativité a été choisi à 5%. Les résultats significatifs sont signalés par une étoile.

II. RESULTATS

II.A. ETUDE PRELIMINAIRE DES LIGNEES CELLULAIRES

II.A.1. Courbes de prolifération et activité métabolique

Les quatre lignées cellulaires ont été utilisées aux passages suivants :

HT29 : 147 à 155	HCT15 : 40 à 44
Caco-2 : 31 à 38	HCT116 : 25 à 30

La prolifération des lignées HT29 (Figure 17), Caco-2 (Figure 18), HCT116 (Figure 19) et HCT15 (Figure 20) a été déterminée par comptage des cellules et par la mesure de l'activité des deshydrogénasses mitochondriales (test au MTT), permettant à la fois l'évaluation du nombre de cellules et de leur activité métabolique. Après dépôt de 10000 cellules par puits (plaque 24 puits), un comptage et un test MTT sont effectués tous les deux jours sur une période de trois semaines, avec un changement régulier du milieu de culture. Afin d'optimiser certains protocoles, un nombre plus important de cellules a été mis en culture (50000 cellules par puits) (Figure 20).

La viabilité cellulaire, déterminée par l'exclusion du bleu Trypan, était comprise entre 85% et 100% durant la période d'étude. L'analyse des courbes réalisées par numération cellulaire met en évidence un début de phase exponentielle au quatrième jour après la mise en culture des cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour le test au MTT (évaluation de la prolifération par densité optique). Dans le cas de ce test, un phénomène de saturation est observé au delà du dixième jour de croissance. Il faut noter que l'activité des deshydrogénasses mitochondriales est différente selon le type cellulaire. La sensibilité du test au MTT est ainsi probablement meilleure pour HCT116 et Caco-2 que pour HT29.

A la vue de ces résultats, nous avons donc choisi d'exposer les cellules aux AINS le troisième jour après la mise en culture (10000 ou 50000 cellules par puits), et d'étudier le pouvoir inhibiteur des différentes molécules du quatrième au sixième jour.

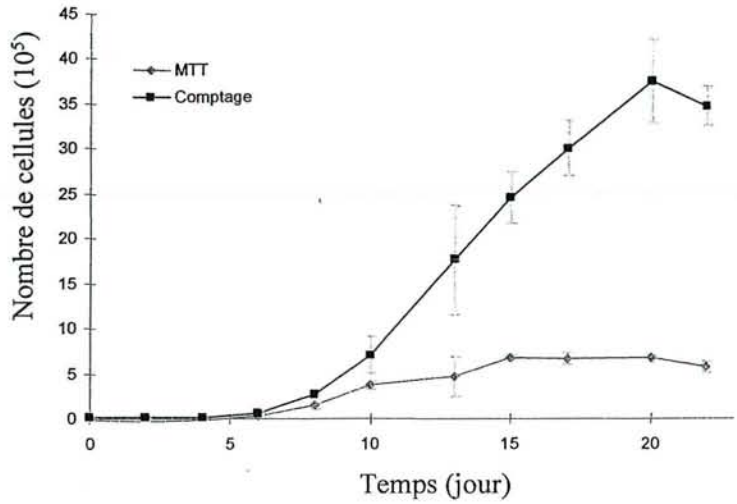


Figure 17 : Courbe de prolifération de la lignée HT29
(mise en culture initiale à 10000 cellules par puits)

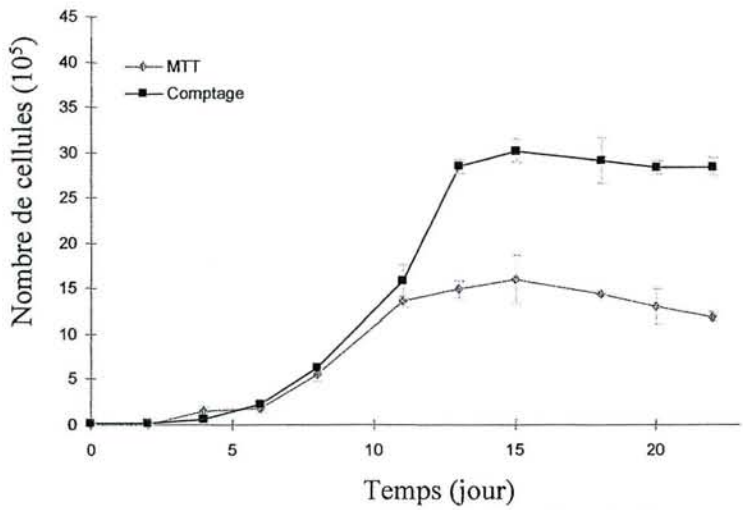


Figure 18 : Courbe de prolifération de la lignée Caco-2
(mise en culture initiale à 10000 cellules par puits)

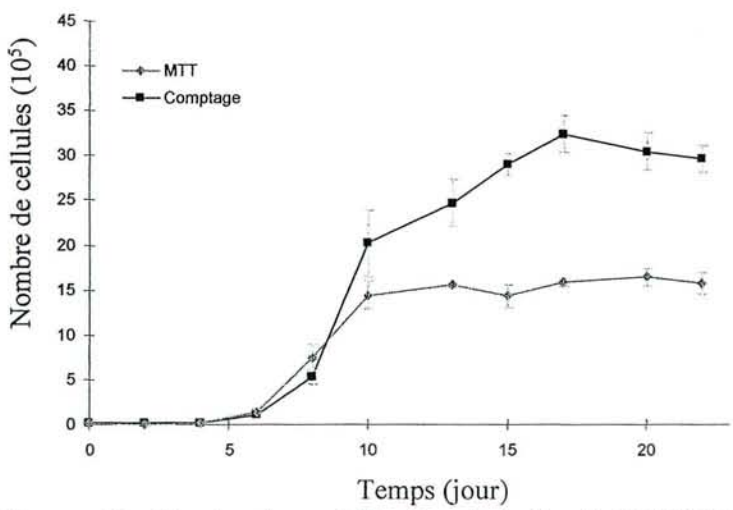


Figure 19 : Courbe de prolifération de la lignée HCT116
(mise en culture initiale à 10000 cellules par puits)

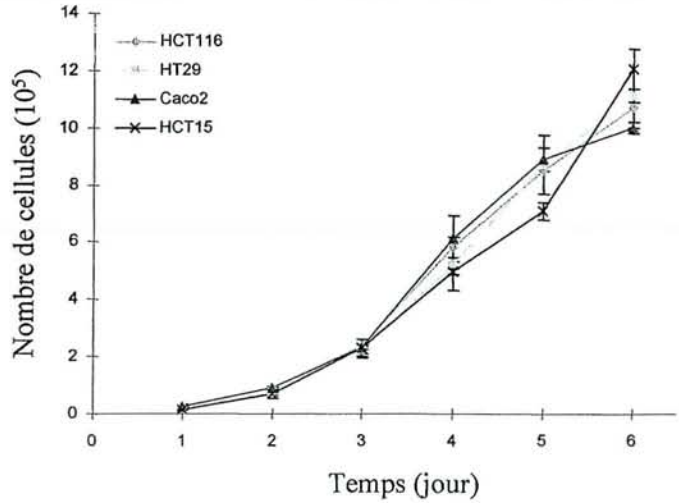


Figure 20 : Courbes de prolifération à forte densité cellulaire
(mise en culture initiale à 50000 cellules par puits)

II.A.2. Etude de la différenciation cellulaire

L'activité phosphatasique alcaline, choisie comme marqueur de différenciation, a été déterminée sur 3 types cellulaires (Tableau VII), avant l'étude du pouvoir inhibiteur des AINS. Aucune augmentation de l'activité PAL en fonction du temps de culture n'a été observée pour les différentes lignées cellulaires. Ainsi, les cellules que nous avons utilisées pour l'étude du pouvoir inhibiteur des AINS sont peu différenciées.

Tableau VII : Etude de la différenciation de trois lignées cellulaires en évaluant l'activité phosphatasique alcaline

mU/mg protéines	**Jour 5**	**Jour 12**
HCT116 (passage 23)	3,78 ± 0,05	3,99 ± 0,52
HT29 (passage 145)	4,43 ± 0,10	2,16 ± 0,05
Caco-2 (passage 29)	3,87 ± 0,30	2,66 ± 0,17

II.A.3. Etude de l'expression des COXs par Western Blot

L'analyse de l'expression des isoenzymes de COX par Western Blot montre une expression constitutionnelle de COX-1 et de COX-2 dans les lignées cellulaires HT29, Caco-2 et HCT116 (Figure 21). Dans nos conditions expérimentales, les isoenzymes de COX sont détectées de façon maximale dans les cellules HT29, alors que COX-2 semble surexprimée par rapport à COX-1 dans les lignées Caco-2 et HCT116. Par contre, aucun signal pour les isoenzymes de COX n'a été détecté dans les cellules HCT15.

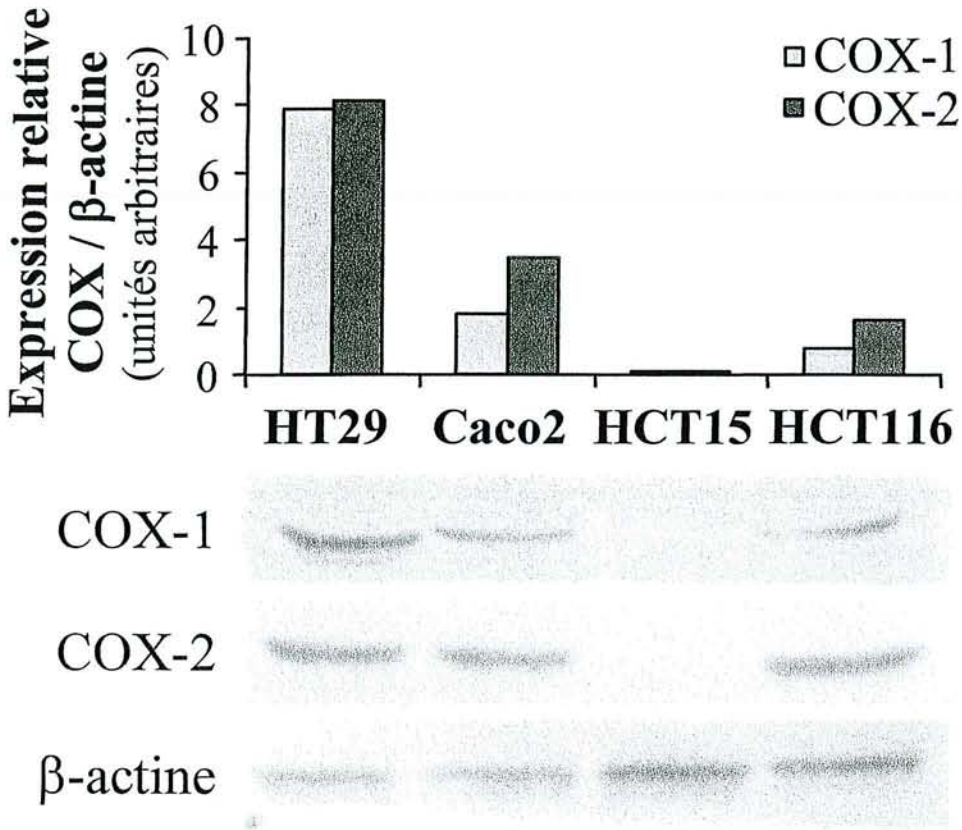


Figure 21 : Mise en évidence de l'expression des protéines COXs par Western Blot
(valeurs densitométriques établies par rapport à la β–actine)

II.B. ETUDE DU POUVOIR INHIBITEUR DES AINS

II.B.1. Effet des AINS sur le métabolisme cellulaire

Les effets d'un panel de 6 AINS (aspirine, célécoxib, indométacine, kétoprofène, NS-398 et sulfure de sulindac) sur le métabolisme des lignées de cancer colorectal HT29 (Figure 22), Caco-2 (Figure 23), HCT15 (Figure 24) et HCT116 (Figure 25), ont été évalués par la mesure de l'activité des déshydrogénases mitochondriales (test au MTT). Les concentrations testées allaient de 10^{-8}M à 10^{-3}M, et les temps de mesure de 24 h à 72 h après incubation avec les différents AINS. Pour des raisons de solubilité dans le milieu de culture et de concentration maximale en DMSO, certains AINS n'ont pas été étudiés à 10^{-3}M (célécoxib, NS-398 et sulfure de sulindac). La lignée HCT15 ayant été introduite plus tardivement que les autres lignées dans notre travail expérimental, celle-ci n'a été étudiée qu'avec certains AINS (aspirine, indométacine, kétoprofène) en regard des effets sur le métabolisme cellulaire.

D'une façon générale, l'inhibition du métabolisme cellulaire des différentes lignées augmente avec la concentration des AINS, ainsi qu'avec le temps d'étude. Les cellules Caco-2 semblent les plus sensibles à l'action des différents AINS.

La sensibilité à l'aspirine est variable entre les quatre lignées (Caco-2 > HCT15/HCT116 > HT29). Une inhibition du métabolisme cellulaire est observée à forte concentration (10^{-3}M) dès 24 h sur les lignées sensibles (Caco-2, HCT15, HCT116), avec des effets à concentration plus faible sur Caco-2.

Une sensibilité variable d'une lignée à l'autre est également observée avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (célécoxib et NS-398) : Caco-2 > HT29 > HCT116. Leurs effets sur le métabolisme cellulaire sont globalement superposables (légère supériorité du NS-398) : une inhibition dès 10^{-5}M est observée à partir de 24 h sur la lignée Caco-2 (célécoxib, NS-398), alors qu'elle apparaît de façon retardée (72 h) à 10^{-4}M sur les lignées HT29 (célécoxib, NS-398) et HCT116 (NS-398).

Au contraire des AINS précédents, la sensibilité du métabolisme cellulaire des quatre lignées à l'indométacine et au kétoprofène semble équivalente.

Une inhibition est observée pour le kétoprofène à forte concentration (10^{-3}M) dès 24 h pour toutes les lignées sauf HT29, sur laquelle l'effet inhibiteur est un peu retardé (à partir de 48 h) mais se manifeste dès 10^{-4}M. Une inhibition est observée à plus faible concentration, dès 10^{-5}M, sur la lignée HCT15 à 72 h.

L'indométacine induit une inhibition du métabolisme cellulaire à forte concentration (10^{-3}M) dès 24 h, majeure à partir de 48 h, sur toutes les lignées cellulaires. Un effet inhibiteur est observé à concentration plus faible (10^{-4}M) à partir de 48 h pour les lignées Caco-2 et HCT116, voire 72 h pour les cellules HT29.

Une inhibition du métabolisme cellulaire est observée avec le sulfure de sulindac à forte concentration (10^{-4}M) dès 24 h sur toutes les lignées étudiées (HT29, Caco-2, HCT116). Un effet inhibiteur apparaît à concentration plus faible (10^{-5}M) pour les temps plus tardifs (48 h ou 72 h).

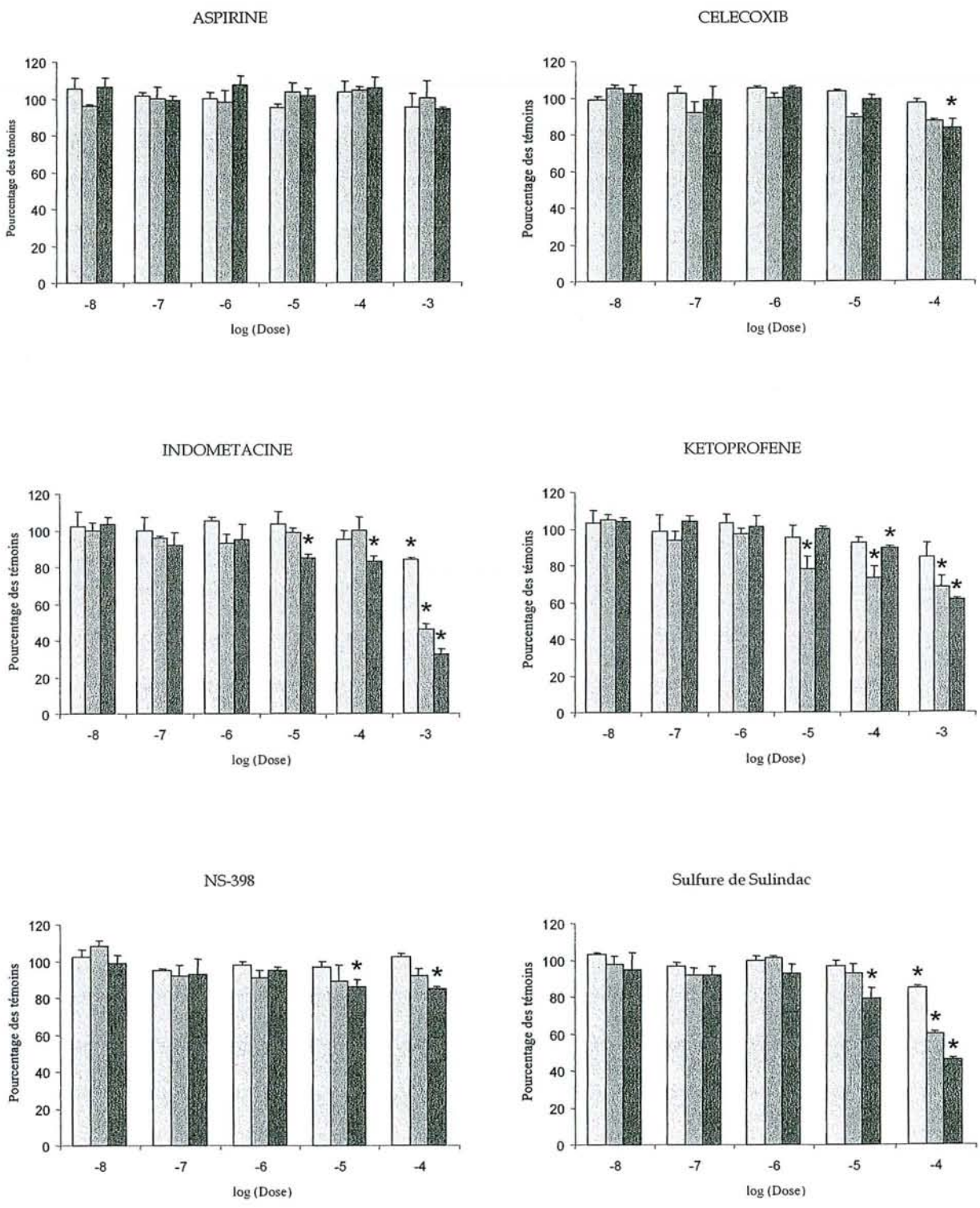


Figure 22 : Effet des AINS sur le métabolisme cellulaire de la lignée HT29 (MTT)

24 h 48 h 72 h * : $p < 0,05$

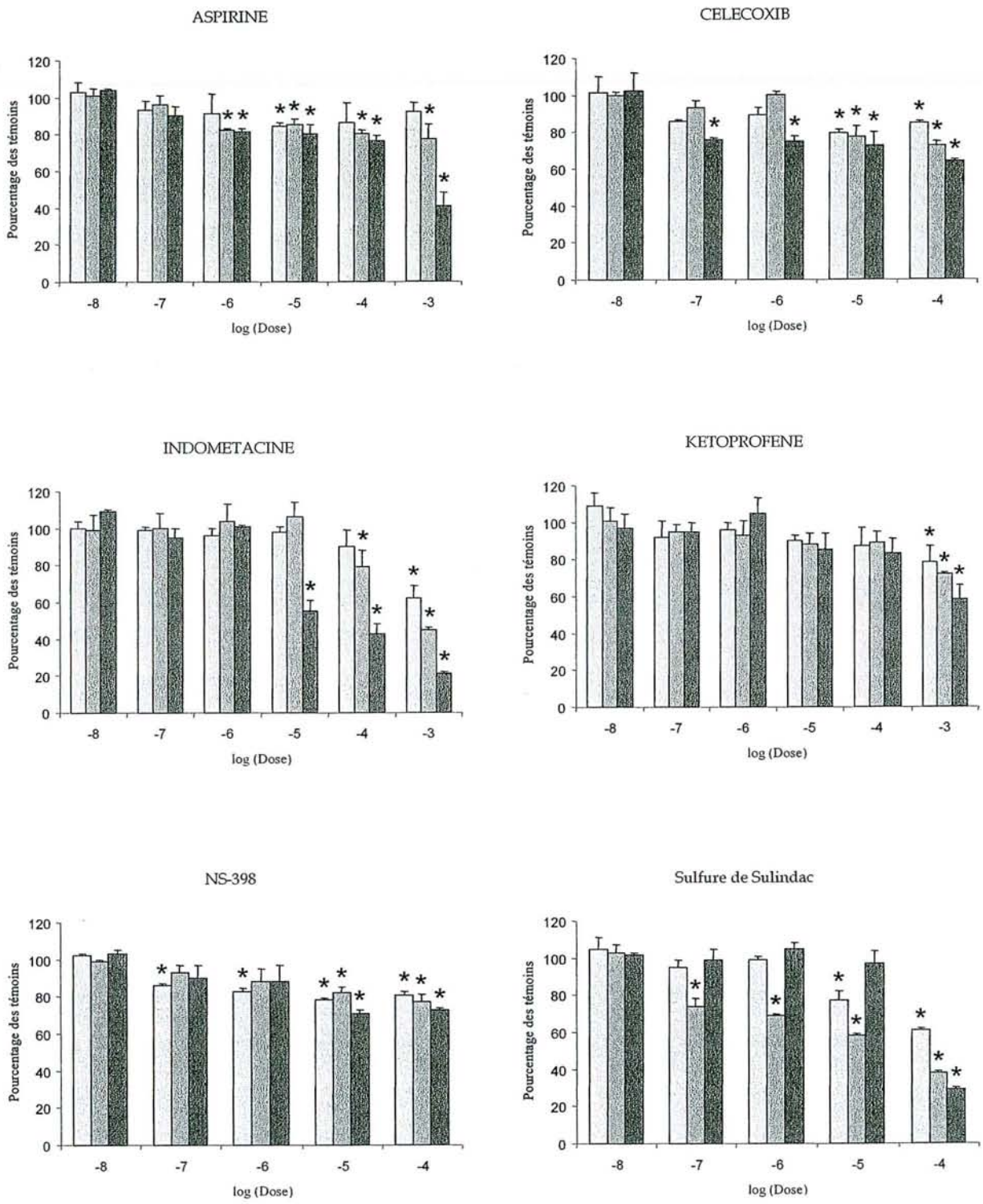


Figure 23 : Effet des AINS sur le métabolisme cellulaire de la lignée Caco-2 (MTT)

24 h 48 h 72 h * : $p < 0,05$

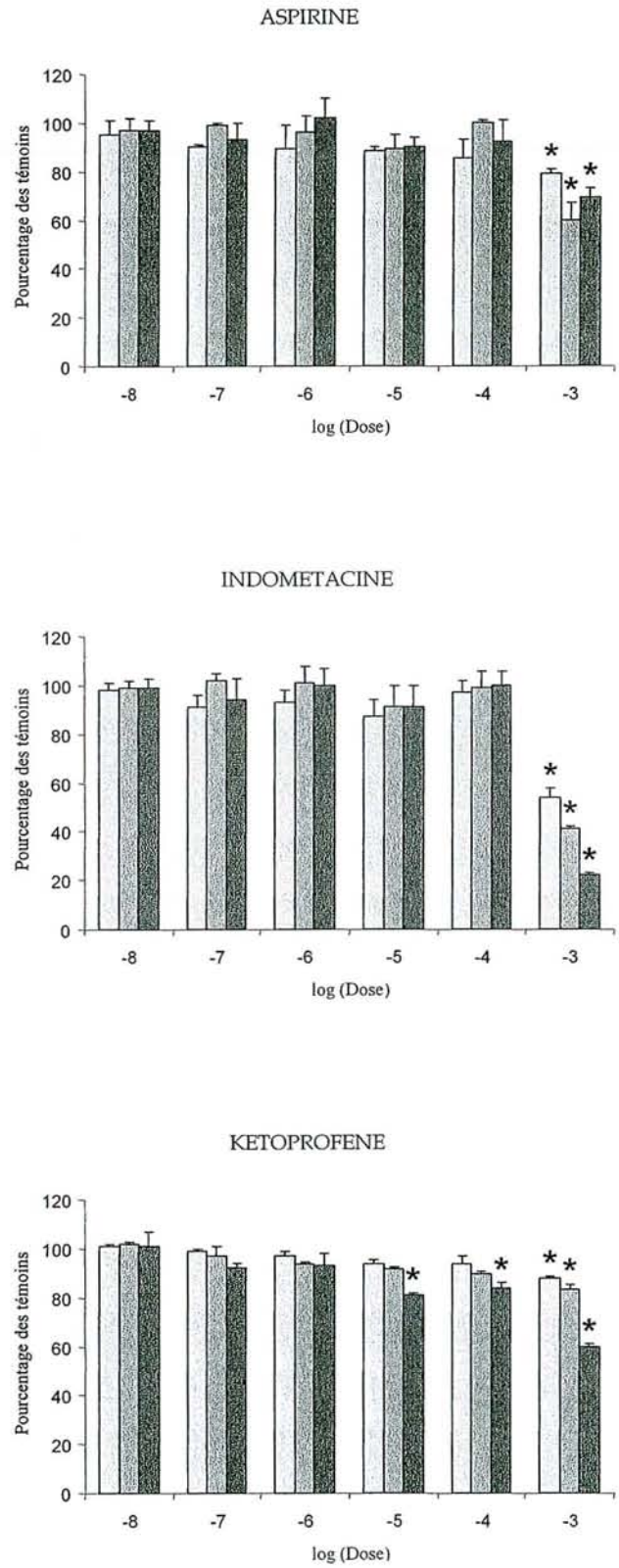


Figure 24 : Effet des AINS sur le métabolisme cellulaire de la lignée HCT15 (MTT)

24 h 48 h 72 h * : $p < 0,05$

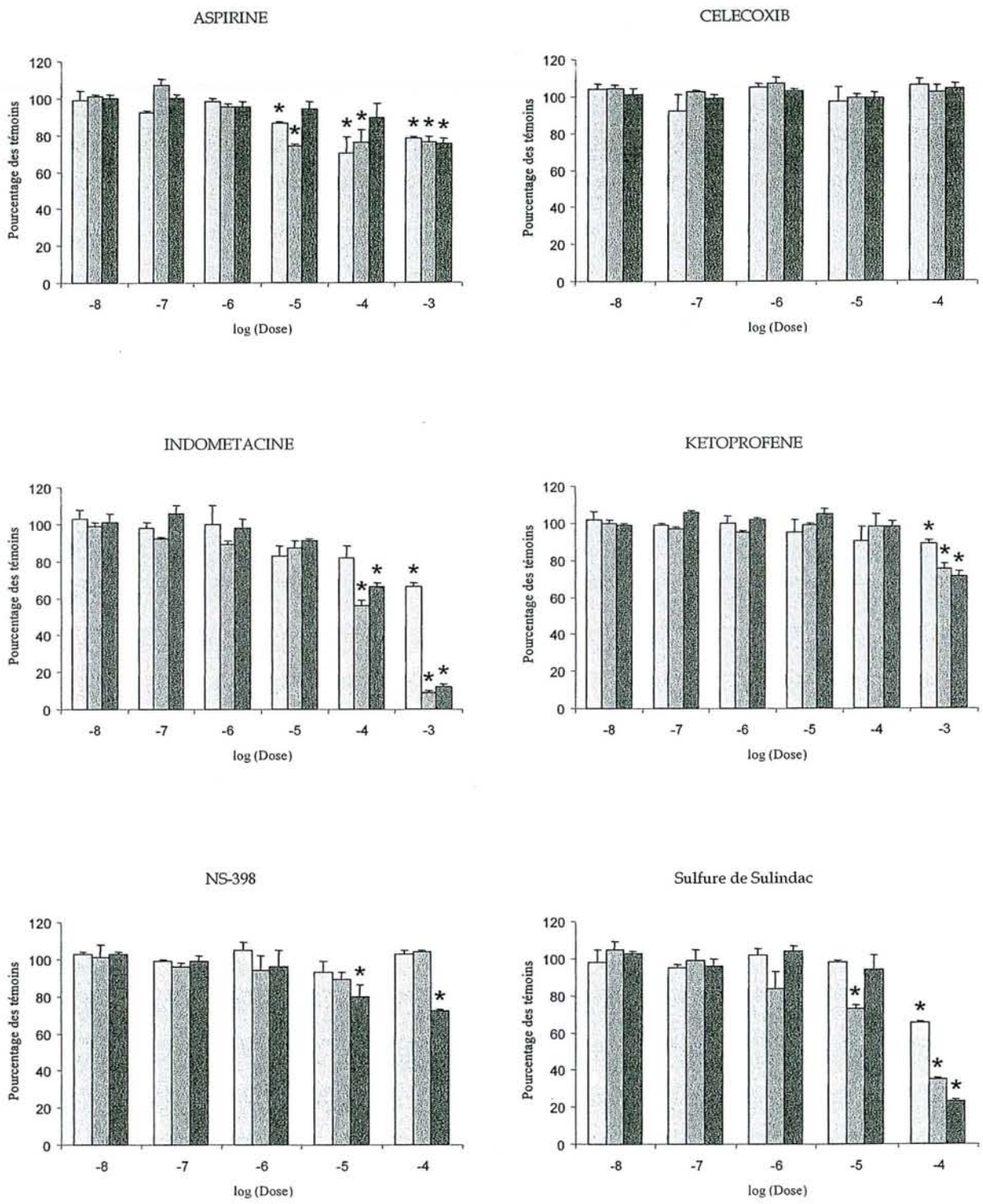


Figure 25 : Effet des AINS sur le métabolisme cellulaire de la lignée HCT116 (MTT)

24 h 48 h 72 h * : $p < 0,05$

II.B.2. Effet des AINS sur la prolifération cellulaire

Après une première étape de screening des AINS réalisée avec le test au MTT, nous avons redéfini le nombre de conditions expérimentales. La concentration 10^{-3}M, utilisée pour l'aspirine, l'indométacine et le kétoprofène, n'a plus été étudiée dans la suite de notre travail expérimental car, en dépit des effets inhibiteurs observés sur le métabolisme cellulaire, cette concentration est peu pertinente d'un point de vue physiologique, et probablement toxique. N'ont été conservées que les concentrations de 10^{-7}M, 10^{-6}M et 10^{-4}M, afin de tester :

- une concentration faiblement inhibitrice des cyclooxygénases (10^{-7}M)
- une concentration « physiologique » et inhibitrice des COXs (10^{-6}M)
- une forte concentration (10^{-4}M), pouvant rendre compte de mécanismes d'action différents de l'inhibition des COXs.

L'étude du pouvoir inhibiteur des AINS sur la prolifération cellulaire des quatre lignées de cancer colorectal a été effectuée après exposition unique des cellules aux différentes molécules, au début de la phase exponentielle de croissance, et suivie pendant 3 jours (Figure 26, Tableau VIII et Tableau IX).

Aux concentrations étudiées, l'aspirine n'a pas d'effet antiprolifératif significatif sur les différentes lignées.

Une inhibition de la prolifération cellulaire est observée à 24 h à forte concentration (10^{-4}M) avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (célécoxib, NS-398) sur toutes les lignées cellulaires. Cet effet inhibiteur se prolonge plus ou moins dans le temps (à 48 h, voire jusqu'à 72 h) selon les lignées : HCT15 > HT29 > Caco-2 > HCT116 (célécoxib), Caco-2 > HCT116 > HT29 > HCT15 (NS-398).

Une diminution de la prolifération de la lignée HCT15, et dans une moindre mesure des cellules HCT116, est observée avec l'indométacine à 10^{-4}M. Aucune modification significative du nombre de cellules n'est retrouvée pour les lignées HT29 et Caco-2.

Un effet antiprolifératif est retrouvé de façon transitoire à 48 h sur les lignées HT29 et Caco-2 avec le kétoprofène à 10^{-4}M, mais pas avec les cellules HCT15 ni HCT116.

Une inhibition majeure de la prolifération cellulaire est observée avec le sulfure de sulindac à forte concentration (10^{-4}M) dès 24 h, et ce, quelles que soient les lignées. Aucun effet n'est retrouvé pour des concentrations plus faibles.

En résumé, des AINS testés, se dégagent essentiellement le sulfure de sulindac, ayant un effet inhibiteur majeur sur la prolifération cellulaire, et les inhibiteurs sélectifs de COX-2. Cette action antiproliférative apparaissant dès 24 h, n'est globalement observée qu'à forte concentration (10^{-4}M). L'inhibition de la prolifération cellulaire, aux concentrations testées, est faible pour l'indométacine et le kétoprofène, voire nulle pour l'aspirine. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec ceux obtenus sur le métabolisme cellulaire (test au MTT), pour lesquels les effets inhibiteurs majeurs de l'aspirine, de l'indométacine et du kétoprofène étaient observés essentiellement à 10^{-3}M. Par contre, l'inhibition du métabolisme cellulaire aux concentrations plus faibles ne se traduit pas par une diminution de la prolifération cellulaire dans nos conditions expérimentales. Ceci suggère que le test au MTT est probablement plus sensible que la mesure de la prolifération cellulaire par comptage. Néanmoins, ce test présente quelques inconvénients dans nos conditions expérimentales : nécessité d'une mise en culture à faible densité cellulaire et phénomènes de saturation du signal avec des cellules à renouvellement rapide comme les cellules cancéreuses.

II.B.3. Effets des AINS sur la différenciation cellulaire

Après 72 heures d'exposition aux AINS, nous n'avons trouvé aucune modification de l'activité phosphatasique alcaline, ce qui suggère que les AINS n'ont pas modifié le phénotype cellulaire.

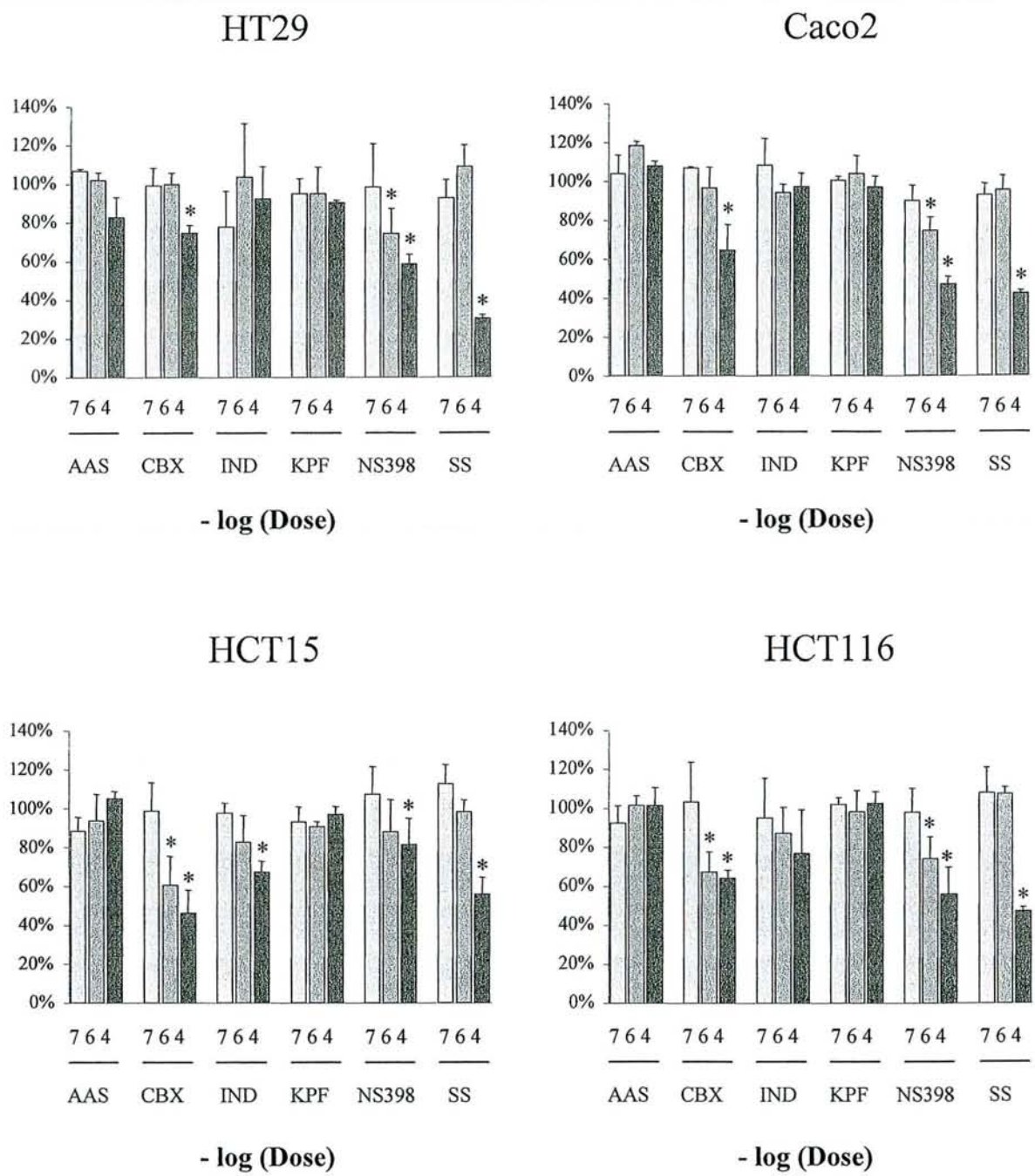


Figure 26 : Effet des AINS sur la prolifération cellulaire des quatre lignées (% des témoins) à 24 h

AAS : aspirine CBX : célécoxib IND : indométacine KPF : kétoprofène SS : sulfure de sulindac * : $p<0,05$

Tableau VIII : Effets des AINS sur la prolifération des lignées HT29 et Caco-2

(% des témoins ± écart-type * : $p < 0,05$)

HT29			
Aspirine	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	107% ± 1%	102% ± 4%	83% ± 10%
48 h	98% ± 7%	94% ± 5%	80% ± 6% *
72 h	103% ± 7%	89% ± 6%	104% ± 9%
Célécoxib	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	99% ± 9%	100% ± 6%	75% ± 4% *
48 h	98% ± 6%	59% ± 5% *	53% ± 3% *
72 h	102% ± 8%	98% ± 9%	84% ± 10%
Indométacine	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	78% ± 18%	104% ± 28%	93% ± 17%
48 h	90% ± 9%	97% ± 3%	94% ± 12%
72 h	93% ± 7%	99% ± 2%	109% ± 14%
Kétoprofène	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	95% ± 8%	95% ± 14%	90% ± 1%
48 h	99% ± 3%	98% ± 3%	73% ± 1% *
72 h	97% ± 5%	86% ± 2%	89% ± 2%
NS-398	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	98% ± 22%	74% ± 13% *	59% ± 5% *
48 h	102% ± 6%	115% ± 8%	112% ± 4%
72 h	101% ± 10%	94% ± 7%	77% ± 7% *
Sulfure de sulindac	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	93% ± 9%	109% ± 11%	31% ± 2% *
48 h	103% ± 3%	108% ± 9%	14% ± 3% *
72 h	95% ± 4%	105% ± 6%	9% ± 2% *
CACO-2			
Aspirine	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	104% ± 9%	109% ± 2%	108% ± 2%
48 h	102% ± 5%	84% ± 11%	79% ± 13%
72 h	104% ± 12%	100% ± 7%	109% ± 3%
Célécoxib	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	107% ± 1%	97% ± 10%	65% ± 13% *
48 h	93% ± 8%	89% ± 6%	78% ± 8% *
72 h	109% ± 5%	101% ± 2%	86% ± 5%
Indométacine	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	109% ± 14%	94% ± 4%	98% ± 7%
48 h	107% ± 11%	123% ± 24%	86% ± 15%
72 h	104% ± 3%	132% ± 23%	71% ± 17%
Kétoprofène	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	101% ± 2%	104% ± 9%	97% ± 5%
48 h	94% ± 1%	96% ± 3%	86% ± 3% *
72 h	95% ± 11%	106% ± 4%	104% ± 2%
NS-398	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	90% ± 8%	75% ± 7% *	47% ± 4% *
48 h	92% ± 5%	86% ± 16%	45% ± 5% *
72 h	83% ± 21%	85% ± 2% *	42% ± 4% *
Sulfure de sulindac	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	98% ± 6%	95% ± 7%	43% ± 2% *
48 h	99% ± 12%	104% ± 12%	13% ± 1% *
72 h	104% ± 1%	109% ± 5%	17% ± 2% *

Tableau IX : Effets des AINS sur la prolifération des lignées HCT15 et HCT116

(% des témoins ± écart-type * : $p < 0,05$)

HCT15			
Aspirine	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	89% ± 7%	94% ± 13%	105% ± 4%
48 h	99% ± 3%	91% ± 1%	99% ± 15%
72 h	99% ± 4%	101% ± 5%	98% ± 1%
Célécoxib	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	99% ± 14%	61% ± 15% *	46% ± 12% *
48 h	93% ± 8%	89% ± 6%	81% ± 7% *
72 h	96% ± 4%	102% ± 6%	82% ± 5% *
Indométacine	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	98% ± 5%	83% ± 14%	67% ± 6% *
48 h	93% ± 6%	91% ± 2%	56% ± 5% *
72 h	116% ± 6%	119% ± 3%	66% ± 4% *
Kétoprofène	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	93% ± 8%	91% ± 3%	97% ± 4%
48 h	98% ± 3%	97% ± 2%	85% ± 3%
72 h	99% ± 5%	93% ± 3%	93% ± 3%
NS-398	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	107% ± 14%	88% ± 16%	82% ± 13% *
Sulfure de sulindac	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	113% ± 10%	98% ± 6%	56% ± 8% *
48 h	104% ± 5%	114% ± 5%	17% ± 10% *
72 h	106% ± 5%	95% ± 3%	13% ± 2% *
HCT116			
Aspirine	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	93% ± 9%	102% ± 5%	101% ± 9%
48 h	102% ± 10%	95% ± 5%	80% ± 14%
72 h	102 ± 3%	102% ± 2%	100% ± 17%
Célécoxib	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	103% ± 20%	67% ± 10% *	64% ± 4% *
48 h	99% ± 7%	88% ± 6%	75% ± 14%
72 h	101% ± 2%	102% ± 4%	93% ± 4%
Indométacine	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	95% ± 20%	87% ± 13%	77% ± 22%
72 h	118% ± 15%	110% ± 16%	45% ± 14% *
Kétoprofène	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	102% ± 3%	98% ± 11%	103% ± 6%
48 h	108% ± 5%	97% ± 9%	89% ± 9%
72 h	105% ± 4%	102% ± 9%	101% ± 4%
NS-398	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	98% ± 12%	74% ± 11% *	56% ± 14% *
48 h	89% ± 14%	86% ± 7%	77% ± 3% *
72 h	93% ± 9%	104% ± 11%	83% ± 3% *
Sulfure de sulindac	**10^{-7}M**	**10^{-6}M**	**10^{-4}M**
24 h	108% ± 13%	107% ± 3%	47% ± 2% *
48 h	104% ± 2%	103% ± 11%	19% ± 4% *
72 h	104% ± 19%	104% ± 7%	15% ± 4% *

II.C. EFFETS DES AINS SUR LE CYCLE CELLULAIRE

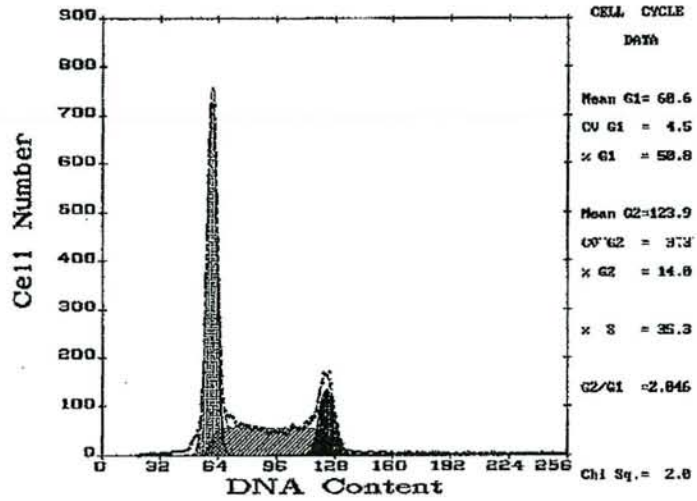
L'effet de 5 AINS (aspirine, indométacine, kétoprofène racémique, NS-398[5], sulfure de sulindac) a ensuite été étudié sur le cycle cellulaire des quatre lignées de cancer colorectal, en traitant les cellules à 2 concentrations d'AINS (10^{-6} et 10^{-4} M) et en les analysant par cytométrie en flux après marquage nucléaire par l'iodure de propidium (Planche 1, Figure 27 et Tableau X).
Les résultats montrent que la répartition des cellules entre les différentes phases du cycle varie avec le temps : augmentation de la phase G_1 et diminution de la phase S de 24 h à 72 h, indépendamment de l'effet propre des AINS, ce qui suggère un ralentissement de la croissance cellulaire au cours du temps. Lorsqu'il existe une modification du cycle cellulaire sous l'effet d'un AINS, les variations rencontrées sont une augmentation de la phase G_1 et une diminution de la phase S, tandis que la phase G_2 varie de façon inconstante.

Aux concentrations étudiées, l'aspirine et le kétoprofène n'ont pas entraîné de modification significative du cycle cellulaire des différentes lignées.
A 24 h, l'indométacine à 10^{-4}M modifie de façon modérée le cycle cellulaire des quatre lignées.
Deux AINS, le NS-398 et le sulfure de sulindac, entraînent à 10^{-4}M dès 24 h une modification significative du cycle cellulaire des lignées HT29, Caco-2 et HCT116. Dans le cas des cellules HCT15, il n'y a pas d'effet significatif, même si une diminution de la proportion des cellules en phase S est observée.

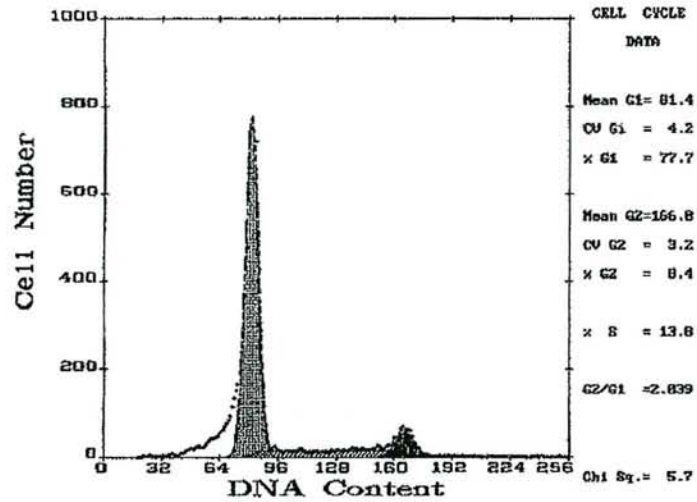
En résumé, ces résultats montrent que le NS-398 et le sulfure de sulindac entraînent une augmentation de la proportion des cellules en phase G_1, avec une diminution parallèle des cellules en phase S, ce qui est compatible avec un blocage du cycle cellulaire en phase G_1. Comme dans le cas des données obtenues sur le métabolisme cellulaire et la prolifération, ces effets sur le cycle sont observés à forte concentration (10^{-4}M), même si les résultats du sulfure de sulindac semblent suggérer des effets à concentration plus faible.

[5] Le célécoxib étant encore en développement à cette phase de notre travail expérimental, nous n'avons pas pu poursuivre notre étude avec cette molécule.

(A)



(B)



(C)

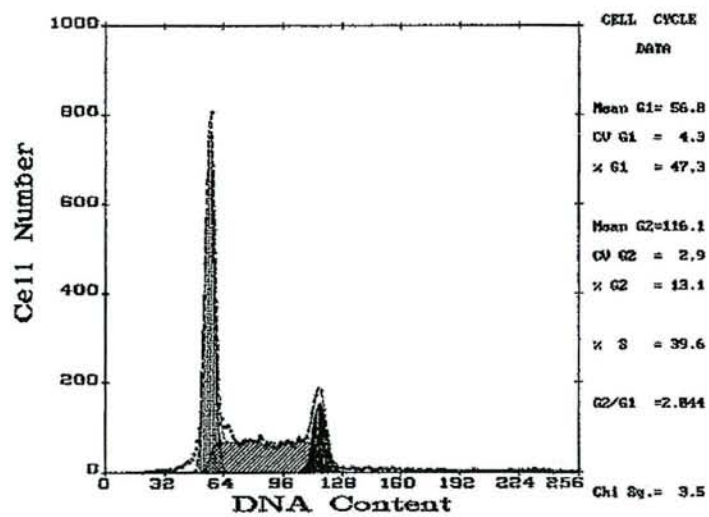


Planche 1 : Exemples d'effet des AINS sur le cycle cellulaire des cellules Caco-2 à 48 h
(A) Témoins (B) Sulfure de sulindac 10^{-4}M (C) Kétoprofène 10^{-4}M

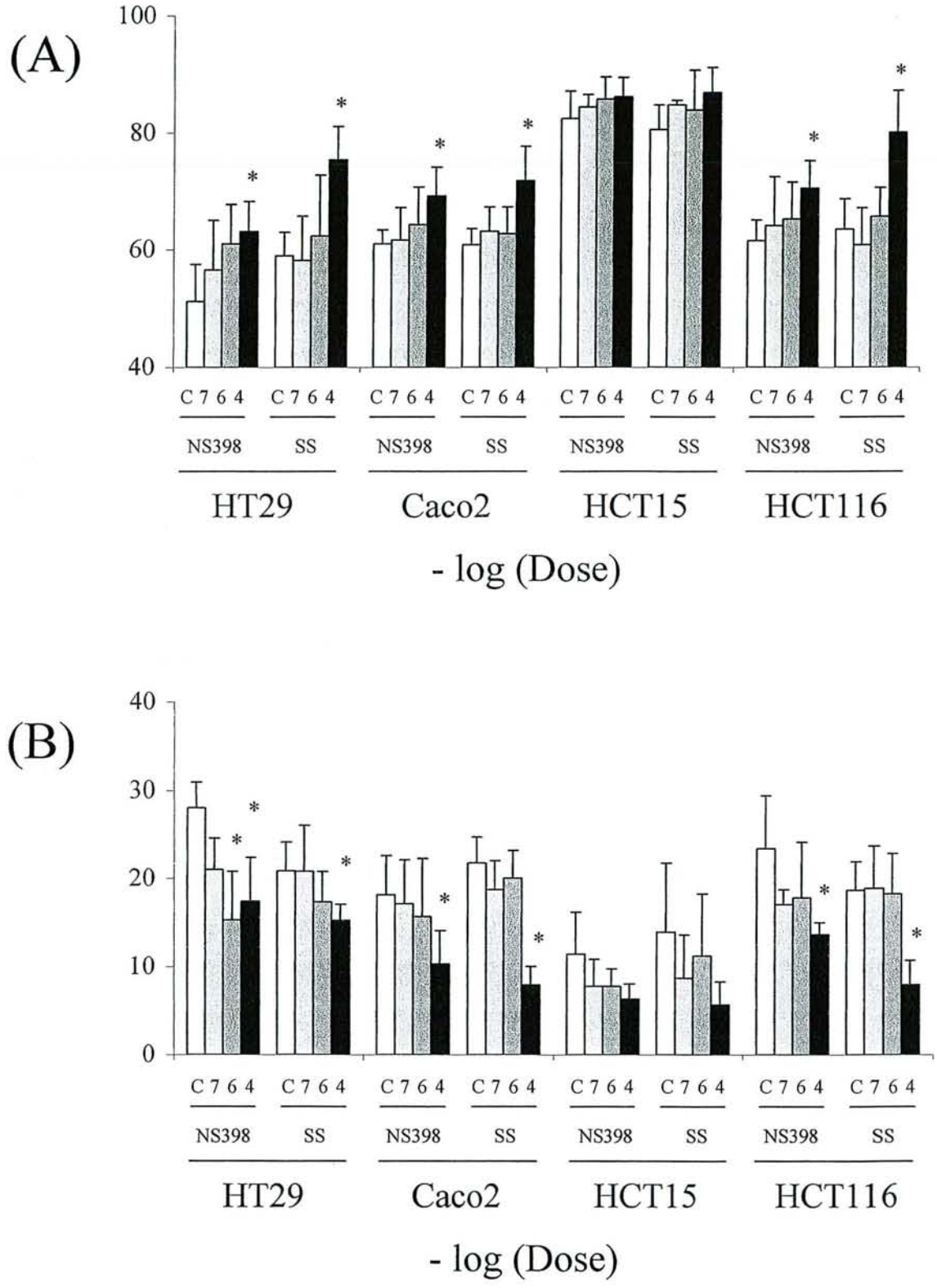


Figure 27 : Effets du NS-398 et du sulfure de sulindac sur le cycle cellulaire à 24 h
(A) Pourcentage des cellules en phase G1 (B) Pourcentage des cellules en phase S
SS : sulfure de sulindac C : témoins * : $p < 0,05$

Tableau X : Effets des AINS sur le cycle cellulaire des lignées de cancer colorectal

HT29							
Temps		24 h		48 h		72 h	
AINS \ Phase du cycle		G_1	S	G_1	S	G_1	S
AAS	Témoin	65,4 ±5,5	22,8 ±2,3	81,0 ±4,3	11,7 ±3,6	75,6 ±3,3	20,8 ±6,2
	10^{-6}M	68,0 ±7,0	22,8 ±5,1	81,8 ±4,5	11,1 ±6,2	77,1 ±6,5	17,5 ±3,2
	10^{-4}M	68,8 ±3,3	20,7 ±6,4	80,5 ±3,7	12,1 ±6,6	76,4 ±7,1	19,6 ±2,7
IND	Témoin	57,7 ±6,0	25,0 ±5,1	64,8 ±5,1	15,9 ±2,0	71,5 ±7,3	22,5 ±4,7
	10^{-6}M	60,7 ±7,4	23,4 ±2,2	67,5 ±4,8	17,1 ±3,9	72,8 ±4,7	19,7 ±5,6
	10^{-4}M	66,9 ±3,5	17,9 ±1,9*	70,0 ±7,0	16,4 ±5,4	73,8 ±3,3	19,6 ±5,4
KPF	Témoin	65,4 ±3,7	22,8 ±4,1	70,5 ±5,1	22,5 ±4,6	75,6 ±7,5	20,8 ±6,6
	10^{-6}M	72,4 ±4,5	17,6 ±3,1	76,0 ±3,7	16,7 ±2,6	78,5 ±6,5	18,1 ±4,0
	10^{-4}M	74,7 ±5,7	17,7 ±6,6	76,7 ±6,1	15,1 ±5,3	81,2 ±3,6	14,4 ±2,9
NS-398	Témoin	51,2 ±6,4	28,1 ±2,9	56,4 ±4,5	24,9 ±2,6	61,3 ±3,5	19,8 ±4,4
	10^{-6}M	61,1 ±6,7	15,3 ±5,5*	65,6 ±5,4	12,5 ±5,0*	72,4 ±4,0*	11,7 ±5,2
	10^{-4}M	63,1 ±5,1*	17,4 ±5,0*	68,7 ±4,5*	13,1 ±5,5*	70,1 ±3,6*	11,3 ±2,3*
SS	Témoin	59,0 ±4,0	20,9 ±3,3	63,5 ±5,5	23,6 ±5,4	71,5 ±6,6	22,5 ±3,6
	10^{-6}M	62,5 ±9,9	17,3 ±3,4	64,8 ±4,4	15,9 ±1,9*	72,6 ±3,3	21,3 ±2,3
	10^{-4}M	75,4 ±5,7*	15,3 ±1,8*	75,2 ±5,8*	13,6 ±3,1*	75,9 ±6,4	8,5 ±4,5*

Caco-2							
Temps		24 h		48 h		72 h	
AINS \ Phase du cycle		G_1	S	G_1	S	G_1	S
AAS	Témoin	68,6 ±6,6	18,8 ±4,8	75,6 ±4,5	16,3 ±3,1	72,9 ±6,6	19,8 ±5,4
	10^{-6}M	68,4 ±5,4	18,8 ±6,6	78,9 ±4,1	10,9 ±5,4	74,0 ±6,1	19,2 ±2,3
	10^{-4}M	76,7 ±7,0	13,8 ±4,0	80,8 ±3,7	8,5 ±5,9	77,6 ±4,4	17,1 ±2,1
IND	Témoin	60,2 ±6,7	24,1 ±4,4	65,8 ±4,2	19,2 ±4,5	72,4 ±6,4	21,3 ±4,7
	10^{-6}M	73,0 ±6,8	18,8 ±4,9	67,9 ±7,0	17,1 ±5,8	72,4 ±3,5	21,3 ±6,1
	10^{-4}M	72,7 ±4,9*	15,6 ±2,0*	71,9 ±3,3	17,3 ±3,3	71,8 ±4,6	21,8 ±1,9
KPF	Témoin	68,6 ±5,4	18,8 ±5,1	70,1 ±4,6	19,8 ±3,0	74,9 ±4,4	17,9 ±5,9
	10^{-6}M	69,6 ±5,3	18,2 ±6,3	78,9 ±5,6	12,9 ±4,5	75,4 ±7,2	17,5 ±3,7
	10^{-4}M	74,3 ±5,8	17,2 ±4,5	78,6 ±5,5	12,4 ±5,1	77,6 ±4,6	17,1 ±2,0
NS-398	Témoin	61,0 ±2,4	18,2 ±4,4	62,9 ±6,1	17,3 ±3,5	70,1 ±3,7	15,4 ±4,5
	10^{-6}M	64,3 ±6,4	15,7 ±6,6	67,4 ±6,3	14,2 ±2,3	75,2 ±6,9	13,8 ±5,4
	10^{-4}M	69,2 ±4,9*	10,3 ±3,8*	70,2 ±3,9	9,7 ±3,6*	78,1 ±7,5	9,7 ±5,3
SS	Témoin	60,9 ±2,8	21,7 ±3,0	65,8 ±4,0	19,2 ±3,6	72,4 ±6,9	21,3 ±2,5
	10^{-6}M	62,8 ±4,5	20,0 ±3,2	70,0 ±7,6	19,0 ±4,9	72,9 ±3,4	20,6 ±5,0
	10^{-4}M	71,8 ±5,9*	7,9 ±2,1*	75,8 ±5,6*	9,6 ±6,4*	77,8 ±7,4	7,1 ±3,1*

HCT15							
Temps		24 h		48 h		72 h	
AINS \ Phase du cycle		G_1	S	G_1	S	G_1	S
AAS	Témoin	71,6 ±3,5	24,5 ±3,8	73,5 ±1,6	21,8 ±3,2	72,3 ±2,8	19,1 ±2,3
	10^{-6}M	73,2 ±2,8	22,1 ±2,0	75,7 ±1,3	20,7 ±1,6	73,7 ±3,7	20,7 ±5,1
	10^{-4}M	75,5 ±2,5	19,0 ±2,8	76,9 ±2,5	19,9 ±2,1	73,4 ±1,4	17,3 ±1,0
IND	Témoin	76,6 ±4,1	19,3 ±6,5	72,5 ±5,4	17,2 ±4,8	76,4 ±6,0	14,5 ±3,1
	10^{-6}M	79,9 ±7,0	16,2 ±4,5	71,3 ±7,0	15,2 ±6,5	75,6 ±3,5	14,4 ±2,2
	10^{-4}M	83,2 ±6,6	13,5 ±5,4	77,3 ±6,2	13,4 ±5,1	78,3 ±6,1	13,1 ±2,5
KPF	Témoin	69,1 ±4,6	26,5 ±2,8	68,8 ±3,3	25,2 ±2,0	67,0 ±4,9	25,6 ±6,4
	10^{-6}M	71,1 ±6,7	24,7 ±6,2	76,7 ±4,8	19,6 ±6,1	70,2 ±7,0	17,4 ±4,3
	10^{-4}M	69,7 ±3,9	25,3 ±3,7	74,3 ±5,7	20,4 ±4,2	74,3 ±5,7	17,5 ±3,2
NS-398	Témoin	82,5 ±4,7	11,4 ±4,8	83,2 ±6,1	10,9 ±3,9	82,3 ±6,7	11,1 ±2,3
	10^{-6}M	85,7 ±3,8	7,8 ±2,0	84,9 ±4,0	8,2 ±4,0	85,8 ±6,7	8,5 ±6,6
	10^{-4}M	86,1 ±3,3	6,3 ±1,7	86,3 ±5,2	6,7 ±2,3	87,4 ±3,8	7,2 ±3,6
SS	Témoin	80,5 ±4,2	13,9 ±7,8	78,5 ±5,5	14,3 ±2,9	81,2 ±7,6	13,7 ±2,8
	10^{-6}M	83,9 ±6,8	11,2 ±7,1	81,3 ±5,5	12,7 ±5,7	82,9 ±4,4	11,3 ±2,0
	10^{-4}M	86,9 ±4,3	5,7 ±2,6	85,6 ±5,9	6,8 ±5,3	87,6 ±4,5	6,3 ±3,1*

HCT116							
Temps		24 h		48 h		72 h	
AINS \ Phase du cycle		G_1	S	G_1	S	G_1	S
AAS	Témoin	57,2 ±5,6	29,3 ±4,4	78,9 ±5,1	15,1 ±6,0	73,8 ±7,3	19,1 ±1,8
	10^{-6}M	64,2 ±4,3	24,6 ±1,9	79,6 ±5,2	12,7 ±2,2	77,3 ±5,7	17,5 ±4,0
	10^{-4}M	69,7 ±4,6*	20,3 ±6,1	79,9 ±3,9	12,6 ±6,3	79,6 ±4,8	16,5 ±4,7
IND	Témoin	66,2 ±5,1	22,1 ±5,7	68,7 ±6,8	19,1 ±4,9	70,9 ±3,5	21,0 ±2,5
	10^{-6}M	66,5 ±4,0	22,3 ±5,1	65,6 ±7,0	21,5 ±4,1	73,2 ±5,9	19,9 ±3,4
	10^{-4}M	72,9 ±5,5	16,2 ±4,2	71,1 ±5,6	17,0 ±2,0	75,5 ±7,0	17,8 ±2,5
KPF	Témoin	57,2 ±4,1	29,3 ±4,7	70,4 ±3,3	24,5 ±4,1	74,0 ±4,2	22,0 ±4,7
	10^{-6}M	66,0 ±6,0	25,3 ±6,4	73,6 ±4,8	18,7 ±5,8	73,8 ±6,3	19,1 ±3,8
	10^{-4}M	66,7 ±5,5	22,5 ±6,2	75,2 ±4,6	18,6 ±5,6	75,7 ±7,2	20,4 ±5,2
NS-398	Témoin	61,6 ±3,5	23,4 ±6,0	71,1 ±6,1	19,9 ±5,1	73,2 ±3,7	18,6 ±1,8
	10^{-6}M	65,3 ±6,2	17,8 ±6,3	77,3 ±6,0	18,9 ±6,6	79,7 ±3,9	15,7 ±3,5
	10^{-4}M	70,5 ±4,7*	13,6 ±1,4*	78,6 ±6,8	17,3 ±2,4	80,6 ±3,5*	12,8 ±4,6
SS	Témoin	63,6 ±5,2	18,7 ±3,3	65,1 ±4,8	17,9 ±6,1	69,8 ±7,6	16,3 ±3,6
	10^{-6}M	65,7 ±4,9	18,3 ±4,6	68,7 ±4,4	16,9 ±2,2	70,5 ±6,7	13,2 ±3,2
	10^{-4}M	80,0 ±7,2*	7,9 ±2,7*	81,3 ±4,2*	7,4 ±2,6*	83,2 ±4,3*	6,8 ±3,6*

AAS : aspirine IND : indométacine KPF : kétoprofène SS : sulfure de sulindac

* : $p < 0,05$

II.D. EFFETS DES AINS SUR L'APOPTOSE

II.D.1. Etude en immunocytochimie

a) Etude de l'apoptose par la technique à l'annexine V

Les protocoles décrits dans la littérature sont variables. Des essais de marquage ont été effectués en présence ou non d'un détergent (saponine 0,2% pendant 5 minutes), avec un marquage à l'annexine V-FITC et un contre-marquage à l'iodure de propidium, effectués simultanément ou séquentiellement, et ce directement sur les tapis cellulaires ou après trypsination des cellules. L'utilisation de la saponine, comme l'action de la trypsine-EDTA, conduit à l'apparition de faux positifs en raison d'une désorganisation de la membrane plasmique (Planche 2A). Le marquage simultané donne des résultats identiques à ceux obtenus après un marquage séquentiel (annexine V-FITC puis iodure de propidium). Nous avons donc opté pour un marquage simultané par l'annexine V-FITC et l'iodure de propidium, directement après fixation des tapis cellulaires.

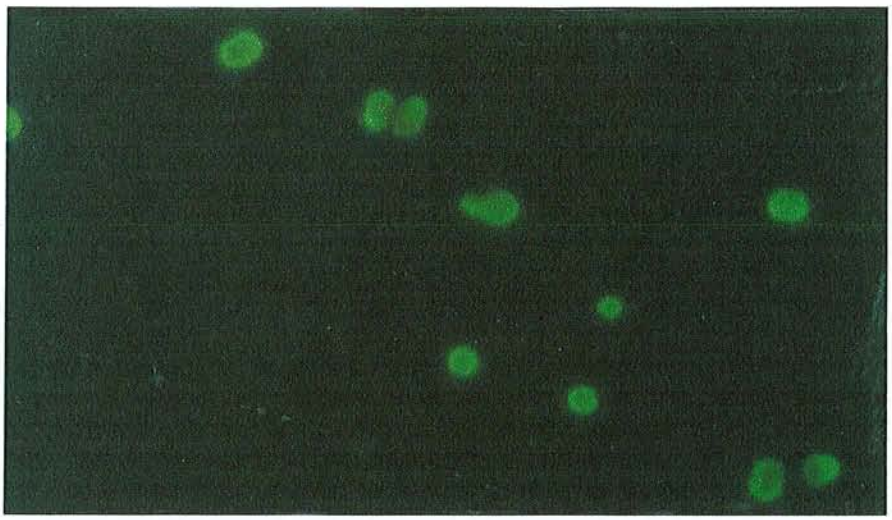
Quatre AINS ont été étudiés (aspirine, kétoprofène racémique, NS-398 et sulfure de sulindac) à deux concentrations (10^{-6}M et 10^{-4}M) au troisième jour après exposition des cellules.

Il n'a pas été possible de montrer une différence significative en terme d'apoptose entre les lames contrôles et les lames traitées par les AINS (Planche 2B).

b) Etude de l'apoptose par la technique Tunel

Quelques cellules apoptotiques ont été mises en évidence sur les différentes lames (Planche 2C), mais aucune comparaison quantitative n'a pas pu être effectuée entre les AINS.

(A)



(B)

(C)

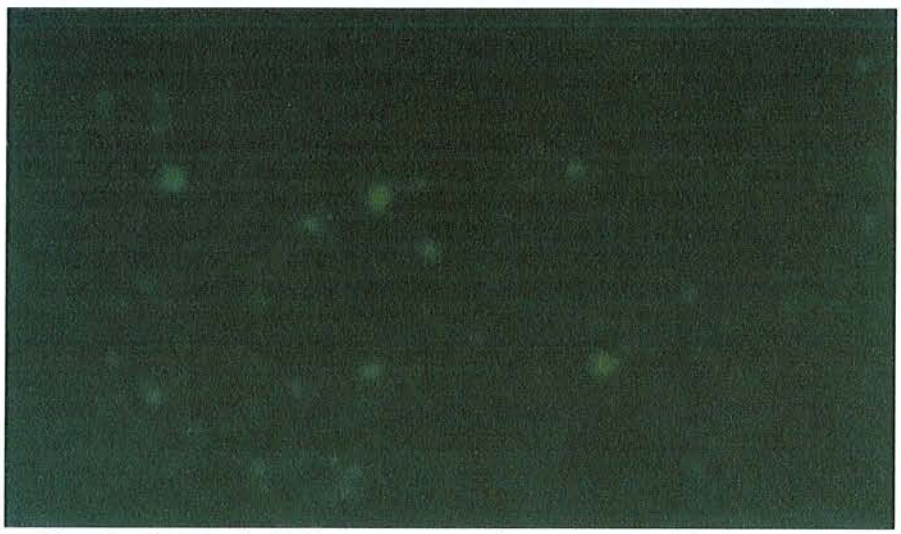


Planche 2 : Etude de l'apoptose par immunocytochimie.

(A) Marquage des cellules HT29 par l'annexine V sans contre coloraction à l'iodure de propidium en présence de 0,2% de saponine.

(B) Marquage des cellules HT29 (72 h après exposition à l'aspirine 10^{-4}M) par l'annexine V avec contre coloration à l'iodure de propidium.

(C) Marquage des cellules HCT15 (72 h après exposition au kétoprofène 10^{-4}M) par la technique de Tunel.

II.D.2. Effets des AINS sur la fragmentation nucléaire (détection du pic subG1)

Les techniques sur lames s'étant révélées peu satisfaisantes pour quantifier les processus apoptotiques, nous avons utilisé des techniques de cytométrie en flux. La détection du pic subG1 après marquage des cellules avec l'iodure de propidium, permet d'évaluer les stades tardifs de l'apoptose (fragmentation nucléaire) (Planche 3).

Les effets pro-apoptotiques des AINS sur nos lignées de cancer colorectal ont été étudiés avec 3 molécules : indométacine, NS-398 et sulfure de sulindac (Figure 28 et Tableau XI).

L'indométacine à 10^{-4}M est responsable d'une faible induction d'apoptose sur les lignées HT29 et Caco-2, et dans une moindre mesure HCT15 et HCT116, à partir de 48h.

Le sulfure de sulindac entraîne une induction significative de l'apoptose, mais seulement à partir de 10^{-4}M : augmentation de 2 à 4 fois le taux d'apoptose par rapport aux témoins, selon le type cellulaire et le temps d'observation. Par contre, le NS-398 n'a pas eu d'effet significatif à 24h, quelle que soit la concentration. Une faible induction d'apoptose est observée à partir des temps plus tardifs.

Les effets de ligands des récepteurs nucléaires aux proliférateurs de peroxysomes (PPARs), WY14643 (PPARα) et ciglitizone (PPARγ), à 10^{-7} et 10^{-5}M, ont été étudiés. Aucune induction d'apoptose n'a été observée.

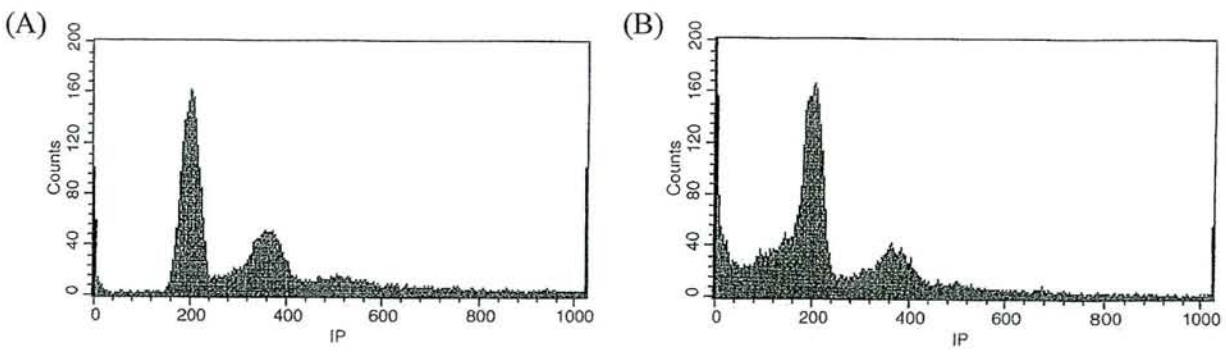


Planche 3 : Effet pro-apoptotique du sulfure de sulindac sur HT29 à 24 h (subG1)
(A) Témoins (B) Sulfure de sulindac 10^{-4}M

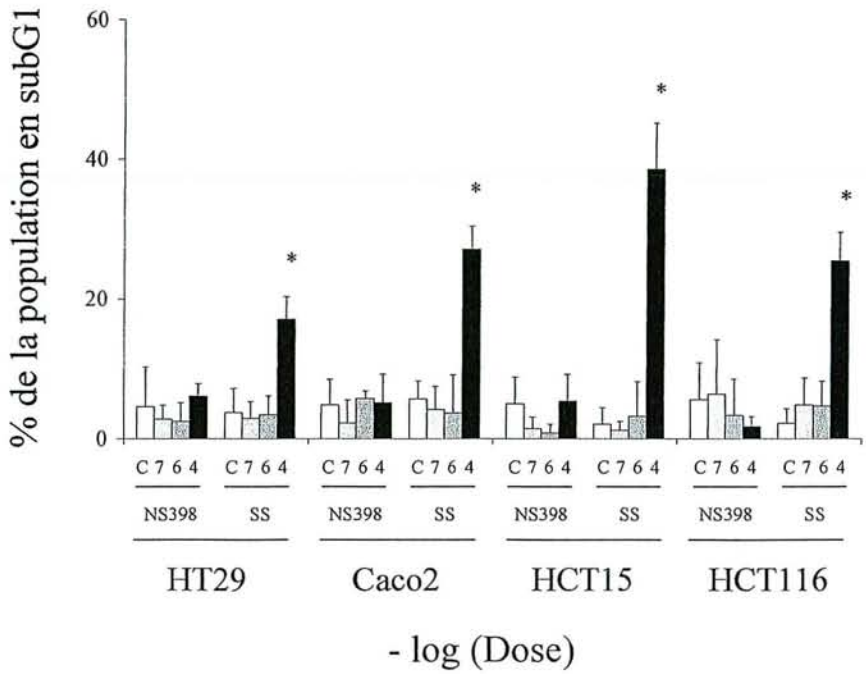


Figure 28 : Effets sur l'apoptose du sulfure de sulindac et du NS-398 (subG1)
SS : sulfure de sulindac C : témoins * : $p < 0,05$

Tableau XI : Mesure de l'apoptose induite par les AINS (technique du $subG_1$)

AINS	**Lignée**	**HT29**			**Caco-2**		
	Temps	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
IND	Témoin	3,6%	4%	7%	5,1%	4%	7,8%
	10^{-4} M	2,4%	6%	10%	6,5%	8%	13%
NS-398	Témoin	4,6%	4%	7%	4,8%	4%	7,8%
	10^{-7} M	2,8%	ND	ND	2,3%	ND	ND
	10^{-6} M	2,5%	ND	ND	5,8%	ND	ND
	10^{-4} M	6,1%	7%	11%	5,2%	8%	10%
SS	Témoin	3,8%	3,2%	6,7%	5,7%	2%	6,6%
	10^{-7} M	2,9%	ND	ND	4,2%	ND	ND
	10^{-6} M	3,5%	3%	9%	3,7%	2%	5%
	10^{-4} M	17,1%*	13%*	29%*	27,1%*	19%*	24%*
AINS	**Lignée**	**HCT15**			**HCT116**		
	Temps	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
IND	Témoin	4,3%	4,5%	6,6%	2%	5,4%	6,2%
	10^{-4} M	5,9%	8%	8%	2,6%	8%	9%
NS-398	Témoin	5%	4,5%	6,6%	5,6%	5,4%	6,2%
	10^{-7} M	1,5%	ND	ND	6,4%	ND	ND
	10^{-6} M	0,8%	ND	ND	3,4%	ND	ND
	10^{-4} M	5,4%	10%	11%	1,8%	5%	8%
SS	Témoin	2,1%	1,6%	3,8%	2,2%	3,5%	4,3%
	10^{-7} M	1,2%	ND	ND	4,9%	ND	ND
	10^{-6} M	3,3%	2%	4%	4,7%	3%	5%
	10^{-4} M	38,5%*	29%*	34%*	25,4%*	21%*	25%*

ND = non déterminé IND : indométacine SS : sulfure de sulindac * : $p < 0,05$

II.D.3. Effets des AINS sur l'apoptose : Technique TUNEL par cytométrie en flux

Nous avons utilisé la technique Tunel (mise en évidence de la fragmentation nucléosomale par incorporation de nucléotides marqués au niveau des extrémités 3'-OH de l'ADN) avec détection par cytométrie en flux à l'aide d'un kit commercialisé (Apoptag®, Oncor Appligène). Cette méthodologie permet de visualiser les modifications nucléaires, donc tardives, de l'apoptose.
Cette étude a été réalisée dans un premier temps avec le sulfure de sulindac puisque c'est l'AINS qui a donné les résultats les plus reproductibles et les plus prononcés, tant en termes de prolifération cellulaire que de modifications du cycle (Tableau XII).

Les résultats ont montré que :

- les lignées ont un taux basal d'apoptose qui est bas (1 à 3%)
- le sulfure de sulindac n'a aucun effet à 10^{-6} M
- le sulfure de sulindac semble favoriser légèrement l'apoptose à 10^{-4} M (5 à 10 %)

Bien que les conclusions soient superposables aux données du sulfure de sulindac en pic subG$_1$, cette technique ne nous a cependant pas semblée suffisamment sensible pour que nous l'utilisions dans la suite de notre travail expérimental.

Tableau XII : Mesure de l'apoptose induite par le sulfure de sulindac (Technique Tunel)

HCT116	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
Témoins	0,4%	2,3%	1,9%	2,7%
Sulfure de sulindac 10^{-6}M	0,5%	1,9%	0,5%	4,3%
Sulfure de sulindac 10^{-4}M	0,5%	5,7%	4,2%	6,2%
HT29	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
Témoins	0,4%	1,7%	2%	1,2%
Sulfure de sulindac 10^{-6}M	0,5%	1,6%	1,4%	4,7%
Sulfure de sulindac 10^{-4}M	0,5%	3,6%	2,1%	9,9%
Caco-2	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
Témoins	0,3%	0,5%	0,8%	1,7%
Sulfure de sulindac 10^{-6}M	0,5%	0,9%	1%	1,2%
Sulfure de sulindac 10^{-4}M	0,9%	2,1%	0,5%	20,5%
HCT15	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
Témoins	0,4%	2,9%	1,9%	2,6%
Sulfure de sulindac 10^{-6}M	0,7%	2%	1,5%	3,1%
Sulfure de sulindac 10^{-4}M	0,8%	0,8%	2,2%	11,6%

II.D.4. Effets des AINS sur l'activité des caspases 3/9 (méthode fluorimétrique)

Parmi les effecteurs de l'apoptose, un rôle grandissant est accordé aux caspases, protéases à cystéine qui s'activent en cascade et ont pour substrat certaines enzymes-clé comme la Poly-ADP-Ribose-Polymérase (PARP) dont le clivage déclenche la fragmentation internucléosomale. Parmi ces enzymes, la caspase 3 semble être un dénominateur commun à plusieurs voies d'induction de l'apoptose, notamment en raison de sa forte activité catalytique vis-à-vis de la PARP. Nous avons donc entrepris de mesurer l'activité caspase 3 sur les lysats cellulaires de nos lignées colorectales, en utilisant un substrat fluorogénique : l'acétyl-DVED-aminométhylcoumarine (Euromedex). Ce substrat n'est pas spécifique de la caspase 3 et permet également de mesurer l'activité de la caspase 9.

Nous n'avons pas observé d'augmentation de l'activité des caspases 3/9 par le sulfure de sulindac à 10^{-6}M, alors qu'il existe une augmentation modérée et transitoire de leur activité avec le sulfure de sulindac à 10^{-4}M, essentiellement à partir de 24 h (Tableau XIII). Le NS-398 et l'indométacine ne semblent entraîner aucune modification de l'activité des caspases 3/9 à 10^{-4}M. L'étoposide 500 µM, utilisé ici comme témoin positif, est responsable d'une augmentation importante et prolongée de l'activité des caspases 3/9.

II.D.5. Effets des AINS sur l'externalisation des phosphatidylsérines membranaires (marquage par l'annexine V mesurée par cytométrie en flux)

De tous les AINS que nous avons testés, le sulfure de sulindac à forte concentration (10^{-4}M) s'est révélé le plus efficace sur les lignées de cancer colorectal, que ce soit en termes d'inhibition de la prolifération ou de modifications du cycle cellulaire, que d'induction de l'apoptose. L'étude de ses effets a alors été complétée par une évaluation de la cinétique d'induction de l'apoptose. L'externalisation des phosphatidylsérines membranaires est un phénomène qui apparaît précocement au cours du processus d'apoptose, avant la fragmentation nucléaire, et qui peut être mesuré par la technique à l'annexine V.

Avec le protocole utilisé en cytométrie en flux, les cellules normales sont négatives pour les 2 marqueurs : Annexine V et Sytox green (fenêtre Low Left), alors que les cellules nécrotiques sont doublement positives (fenêtre Upper Right). Les cellules apoptotiques sont marquées par l'annexine V, mais sont imperméables au Sytox green (fenêtre Upper Left) (Planche 4).

Le sulfure de sulindac à 10^{-4}M entraîne une externalisation précoce des phosphatidylsérines membranaires, significative après 18 h d'incubation avec l'AINS, sauf sur la lignée HCT15, pour laquelle le phénomène apparaît de façon retardée (maximum après 24 h) (Figure 29).

Tableau XIII : Activité des caspases 3/9, normalisée par la quantité de protéines

HT29	**3 h**	**6 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
Sulfure de sulindac 10^{-6}M	105%	96%	96%	98%	130%	100%	110%
Ecart-type	4%	1%	10%	11%	28%	6%	13%
Sulfure de sulindac 10^{-4}M	100%	107%	106%	130%	278%	238%	151%
Ecart-type	4%	5%	6%	21%	27%	17%	1%
NS-398 10^{-4}M	ND	ND	ND	ND	103%	126%	108%
Indométacine 10^{-4}M	ND	ND	ND	ND	129%	151%	162%
Etoposide 500 µM	ND	ND	ND	ND	405%	620%	459%
Caco-2	**3 h**	**6 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
Sulfure de sulindac 10^{-6}M	88%	103%	104%	111%	97%	99%	99%
Ecart-type	7%	4%	9%	2%	15%	10%	0%
Sulfure de sulindac 10^{-4}M	95%	105%	132%	326%	202%	186%	157%
Ecart-type	4%	13%	15%	54%	28%	21%	41%
NS-398 10^{-4}M	ND	ND	ND	ND	111%	98%	110%
Indométacine 10^{-4}M	ND	ND	ND	ND	114%	119%	138%
Etoposide 500 µM	ND	ND	ND	ND	464%	661%	481%
HCT15	**3 h**	**6 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
Sulfure de sulindac 10^{-6}M	98%	110%	111%	110%	109%	96%	101%
Ecart-type	3%	9%	5%	12%	19%	1%	4%
Sulfure de sulindac 10^{-4}M	105%	140%	159%	322%	116%	83%	107%
Ecart-type	5%	21%	24%	87%	22%	19%	35%
NS-398 10^{-4}M	ND	ND	ND	ND	100%	102%	104%
Indométacine 10^{-4}M	ND	ND	ND	ND	102%	106%	114%
Etoposide 500 µM	ND	ND	ND	ND	1078%	1080%	1732%
HCT116	**3 h**	**6 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**
Sulfure de sulindac 10^{-6}M	100%	101%	94%	89%	108%	102%	105%
Ecart-type	2%	9%	1%	19%	8%	3%	8%
Sulfure de sulindac 10^{-4}M	104%	110%	118%	252%	185%	143%	129%
Ecart-type	11%	14%	21%	48%	52%	36%	37%
NS-398 10^{-4}M	ND	ND	ND	ND	83%	112%	105%
Indométacine 10^{-4}M	ND	ND	ND	ND	100%	136%	148%
Etoposide 500 µM	ND	ND	ND	ND	534%	527%	462%

Résultats exprimés en % des témoins ND : non déterminé

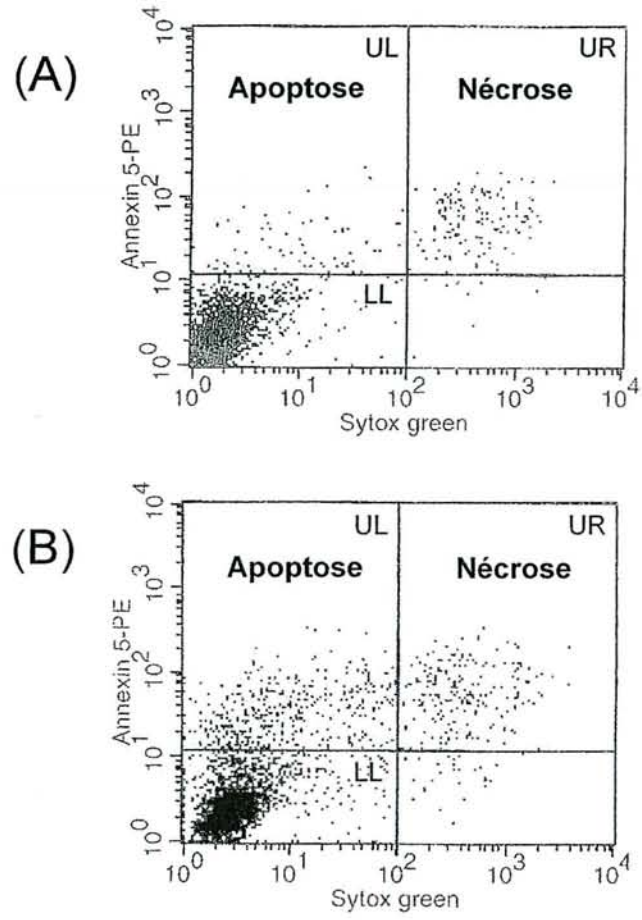


Planche 4 : Effet pro-apoptotique du sulfure de sulindac sur HT29 à 18h (Annexine V)
(A) Témoin (B) Sulfure de sulindac 10^{-4}M

LL : Low Left UL : Upper Left UR : Upper Right

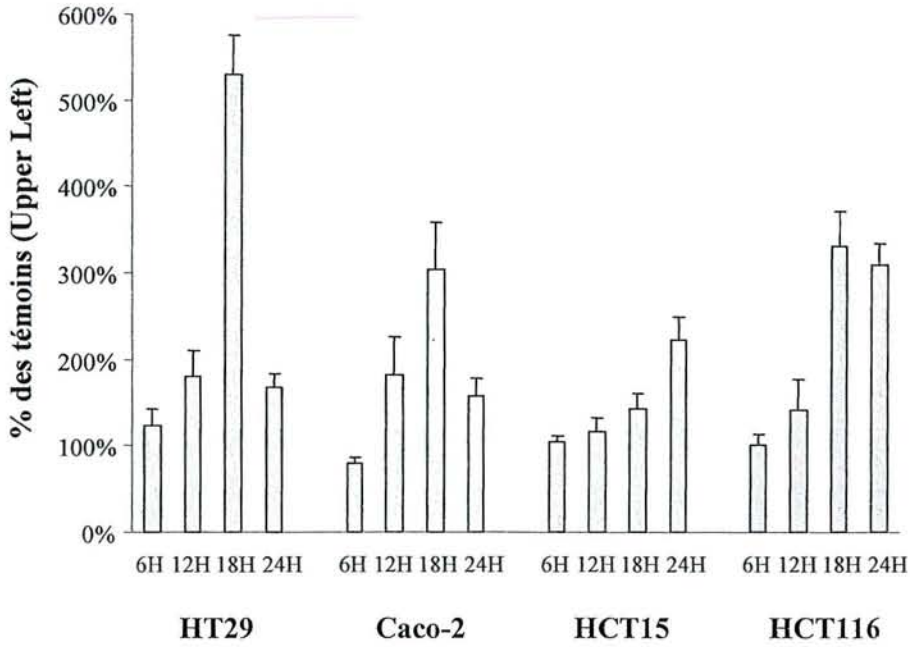


Figure 29 : Cinétique de l'effet pro-apoptotique du sulfure de sulindac à 10^{-4}M (Annexine V)

II.E. EFFETS DES AINS SUR LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES

II.E.1. Effets des AINS sur le taux intracellulaire d'ATP

Lors d'une étude préliminaire destinée à évaluer les conséquences du découplage éventuel de la phosphorylation oxydative par les AINS, nous avons suivi l'évolution du taux intracellulaire d'ATP dans les différentes lignées.

Nous avons préalablement délimité la zone de travail optimale pour ce dosage. Une relation linéaire entre l'intensité de la luminescence et le nombre de cellules (taux intracellulaire d'ATP) a été obtenue entre 250000 et 1000000 cellules, ce qui correspond à nos conditions expérimentales. La validation de la méthode a été effectuée à l'aide de deux agents découpleurs de la phosphorylation oxydative mitochondriale, le FCCP (50 µM) et le mClCCP (5 µM) incubés pendant 15 minutes et 1 heure, à température ambiante, en présence de 500 000 cellules (Tableau XIV).

Tableau XIV : Effet des agents découpleurs sur les quatre lignées

	HT29	Caco-2	HCT15	HCT116
mClCCP 15 min	48%	46%	ND	ND
mClCCP 60 min	18%	19%	ND	ND
FCCP 15 min	49%	52%	ND	ND
FCCP 60 min	14%	16%	54%	29%

Résultats exprimés en % des témoins ND : non déterminé

Le pouvoir découpleur de 4 AINS (aspirine, kétoprofène racémique, NS-398, sulfure de sulindac) a été étudié ensuite à 3 concentrations (10^{-7}M, 10^{-6}M et 10^{-4}M) sur les 4 lignées avec une incubation de 24 h à 37°C. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence par rapport aux témoins. Ceci s'explique probablement parce que les taux intracellulaires d'ATP mesurés ont été normalisés par la teneur en protéines des culots cellulaires afin de tenir compte des variations du nombre de cellules (effet antiprolifératif des AINS). Les agents découpleurs utilisés comme contrôles positifs (mClCCP et FCCP) étant actifs dès 15 minutes, la même expérience a été effectuée après 1 heure d'exposition aux différents AINS, afin de limiter toute variation du nombre des cellules.

Les effets observés sur le taux intracellulaire d'ATP sont variables selon la lignée, l'AINS et sa concentration (Tableau XV). Deux AINS se distinguent particulièrement par leur aptitude à diminuer les concentrations intracellulaires d'ATP : le sulfure de sulindac sur HCT116 et HT29, quelle que soit la concentration, et l'aspirine à 10^{-4}M sur HCT116 et HCT15. Les autres molécules

ne semblent pas modifier le contenu cellulaire en ATP. Compte tenu des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques observés pour le sulfure de sulindac, ces résultats préliminaires nous ont incité à poursuivre l'investigation de la participation d'un dysfonctionnement mitochondrial dans les propriétés antiprolifératives du sulfure de sulindac.

Tableau XV : Effet découpleur des AINS sur les quatres lignées (1 h d'incubation dans du PBS)

AINS	log (dose)	HT29	Caco-2	HCT15	HCT116
Aspirine	-7	98%	110%	54%	108%
	-6	99%	94%	88%	107%
	-4	96%	100%	30%	49%
Kétoprofène	-7	82%	90%	74%	102%
	-6	93%	92%	121%	114%
	-4	91%	107%	82%	106%
NS-398	-7	96%	77%	142%	100%
	-6	107%	108%	153%	101%
	-4	100%	102%	90%	105%
Sulfure de sulindac	-7	25%	100%	88%	33%
	-6	12%	95%	103%	31%
	-4	14%	89%	117%	26%

Résultats exprimés en % du témoin (n = 1 représentant 3 puits)

II.E.2. Effets des AINS sur le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$)

Pour évaluer plus précisément le potentiel découpleur des AINS dans les conditions expérimentales correspondant à leurs effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques, nous avons utilisé une technique de cytométrie en flux basée sur la sonde cationique fluorescente JC-1, qui permet de mesurer le potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\psi_m$.

Dans un premier temps, nous avons étudié la cinétique du pouvoir découpleur du sulfure de sulindac à 10^{-4}M (Tableau XVI), en la comparant à celle du FCCP 50 µM, pris comme molécule de référence (Tableau XVII). Nous avons ensuite comparé les effets découpleurs du sulfure de sulindac et du NS-398 à 3 concentrations (10^{-7}M, 10^{-6}M et 10^{-4}M) après 18 h incubation (Figure 30). Pour cette expérience, nous avons choisi comme comparateur, la plus petite concentration de FCCP (7,5 µM) permettant d'obtenir un découplage significatif (Tableau XVIII).

Dans toutes les conditions expérimentales, la fluorescence verte (monomères) n'a pas été modifiée, ce qui suggère une masse mitochondriale constante [Mancini et coll, 1997] (Figure 30A). Par contre, les valeurs de la fluorescence rouge (agrégats) permettent de distinguer des cellules à forte fluorescence rouge, correspondant à une population à $\Delta\psi_m$ élevé, dite « Upper Right » dans la Figure 30B, et des cellules à faible fluorescence rouge, correspondant à une population à $\Delta\psi_m$ bas,

dite « Low Right » dans la même figure. D'une façon générale, les témoins sont essentiellement composés de cellules à $\Delta\psi_m$ élevé : 86% à 95% de la population totale à 18 h, selon le type cellulaire.

Le sulfure de sulindac à 10^{-4}M entraîne un découplage de la phosphorylation oxydative, se traduisant par une augmentation des cellules à $\Delta\psi_m$ bas. Cet effet qui est détectable dès la 12ème h, devient significatif dans toutes les lignées après 18 h d'incubation avec l'AINS (Tableau XVI). Sur nos lignées de cancer colorectal, le FCCP à 50 µM entraîne un découplage de la phosphorylation oxydative plus précoce (6 h) et plus important que celui observé avec le sulfure de sulindac (Tableau XVII).

Dans l'étude comparative du sulfure de sulindac et du NS-398, seul le sulfure de sulindac à forte concentration (10^{-4}M) est responsable d'une chute du $\Delta\psi_m$, les cellules à $\Delta\psi_m$ élevé ne représentant plus que 76% à 87% de la population totale (Figure 30B), alors que des concentrations plus faibles sont sans effets. L'incubation des cellules avec le NS-398 n'entraîne pas de changement dans la proportion des populations à $\Delta\psi_m$ bas ou élevé, même à 10^{-4}M. Dans ces conditions expérimentales, le FCCP à 7,5 µM entraîne une augmentation de la proportion de cellules à $\Delta\psi_m$ bas, à des niveaux proches (HCT15, HCT116) ou supérieurs (HT29, Caco-2) de ceux obtenus avec le sulfure de sulindac 10^{-4}M (Figure 30B).

Tableau XVI : Cinétique de l'effet découpleur du sulfure de sulindac à 10^{-4}M

	6 h	12 h	18 h
HT29	130%	168%	441%*
Ecart-type	39%	82%	161%
Caco-2	99%	200%*	195%*
Ecart-type	14%	23%	47%
HCT15	94%	122%	161%*
Ecart-type	9%	27%	33%
HCT116	95%	187%	279%*
Ecart-type	19%	51%	99%

Résultats exprimés en % du témoin (fenêtre Low Right)
* : $p < 0,05$

Tableau XVII : Cinétique de l'effet découpleur du FCCP à forte concentration

HT29	**6 h**	**12 h**	**18 h**
FCCP 50 µM	612%*	462%*	364%*
Ecart-type	53%	77%	85%
Caco-2	**6 h**	**12 h**	**18 h**
FCCP 50 µM	476%*	500%*	488%*
Ecart-type	20%	31%	17%
HCT15	**6 h**	**12 h**	**18 h**
FCCP 50 µM	212%*	273%*	297%*
Ecart-type	46%	58%	65%
HCT116	**6 h**	**12 h**	**18 h**
FCCP 50 µM	180%*	763%*	358%*
Ecart-type	31%	74%	7%

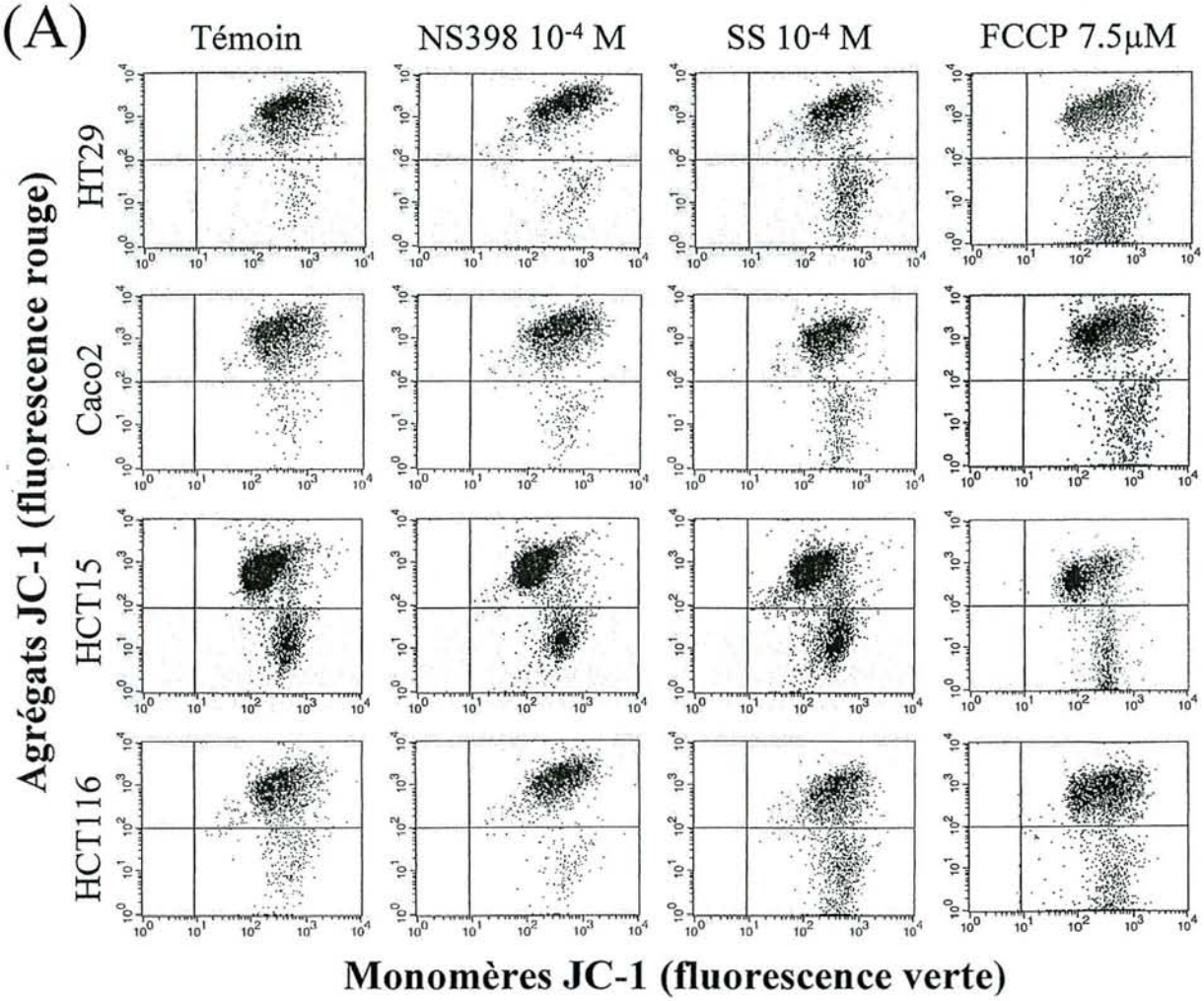
Résultats exprimés en % du témoin (fenêtre Low Right)
* : $p < 0,05$

Tableau XVIII : Dose-réponse de l'effet découpleur du FCCP (18 h d'incubation)

[FCCP] / Lignée	HT29	Caco-2	HCT15	HCT116
5 µM	124 ± 40	118 ± 30	114 ± 29	118 ± 31
7,5 µM	340 ± 30*	385 ± 35*	180 ± 15*	352 ± 28*
10 µM	300 ± 50*	550 ± 98*	197 ± 37*	229 ± 20*
50 µM	350 ± 40*	470 ± 34*	305 ± 42*	370 ± 30*

Résultats exprimés en % du témoin (fenêtre Low Right)
* : $p < 0,05$

(A)



(B)

UPPER RIGHT

	Témoin	NS 10-7	NS 10-6	NS 10-4	SS 10-7	SS 10-6	SS 10-4	FCCP 7.5
HT29	95.2 ± 1.6	94.1 ± 2.5	94.3 ± 1.9	94.7 ± 2.1	93.5 ± 2.1	92.4 ± 3.6	79.3 ± 7.3 *	61.5 ± 6.8 *
Caco2	93.2 ± 3.6	91.7 ± 2.4	93.1 ± 3.1	93.5 ± 1.6	92.4 ± 2.7	93.0 ± 2.0	87.2 ± 2.4 *	74.8 ± 3.6 *
HCT15	85.5 ± 3.2	83.8 ± 4.1	82.0 ± 5.8	85.4 ± 3.4	83.8 ± 2.0	78.2 ± 3.7	76.3 ± 3.3 *	74.2 ± 1.1 *
HCT116	91.5 ± 3.0	90.9 ± 3.7	90.2 ± 4.4	90.1 ± 5.7	88.8 ± 5.7	90.4 ± 3.1	78.1 ± 7.9 *	73.5 ± 1.0 *

LOW RIGHT

	Témoin	NS 10-7	NS 10-6	NS 10-4	SS 10-7	SS 10-6	SS 10-4	FCCP 7.5
HT29	4.6 ± 1.5	5.7 ± 2.4	5.4 ± 1.8	5.0 ± 2.2	6.1 ± 2.2	7.3 ± 3.5	20.3 ± 7.4 *	38.7 ± 8.7 *
Caco2	6.2 ± 3.8	7.6 ± 3.1	6.4 ± 3.4	6.0 ± 1.5	6.9 ± 3.0	6.3 ± 2.1	12.1 ± 2.9 *	23.9 ± 6.4 *
HCT15	14.1 ± 3.5	15.7 ± 4.5	17.5 ± 6.0	14.2 ± 3.8	15.9 ± 1.6	21.4 ± 4.1 *	22.7 ± 4.7 *	25.4 ± 2.5 *
HCT116	7.3 ± 4.0	7.5 ± 4.9	8.6 ± 3.6	9.0 ± 6.1	10.6 ± 6.2	8.9 ± 3.9	20.4 ± 7.2 *	25.7 ± 2.6 *

Figure 30 : Effets sur le $\Delta\psi_m$ du sulfure de sulindac et du NS-398 à 18h

(A) Diagrammes représentatifs de la fluorescence JC-1 sur des cellules contrôles ou incubées pendant 18 h avec du NS-398 ou du sulfure de sulindac. (B) Estimation des sous-populations en fonction de la fluorescence rouge en JC-1. Upper Right correspond aux cellules à forte fluorescence rouge ($\Delta\psi_m$ élevé), Low Right aux cellules à faible fluorescence rouge ($\Delta\psi_m$ bas). Données exprimées en pourcentage moyen ± écart-type des cellules dans la fenêtre correspondante. NS : NS-398 SS : Sulfure de sulindac * : $p<0,05$

II.E.3. Effets des AINS sur le démasquage de l'épitope 7A6

Les effets du sulfure de sulindac et du NS-398, à 3 concentrations (10^{-7}M, 10^{-6}M et 10^{-4}M), ainsi que du FCCP à 50 µM, ont été évalués sur le démasquage de l'épitope mitochondrial 7A6, marqueur d'apoptose, et récemment corrélé à la libération de cytochrome *c* par la mitochondrie [Carthy et coll, 1999].

Comme dans le cas des expériences précédentes, le sulfure de sulindac à 10^{-4}M entraîne une augmentation du marquage, détectable vers 12 h, et significative à 18 h après incubation avec l'AINS, alors que des concentrations plus faibles (10^{-7}M et 10^{-6}M) n'ont aucun effet (Planche 5 et Figure 31). L'incubation des cellules avec le NS-398 ne modifie pas le démasquage de l'épitope 7A6, quelle que soit la concentration. Le FCCP à 50 µM est responsable d'un effet précoce et intense, quelle que soit la lignée étudiée, mais l'intensité de la réponse observée ne permet pas d'exclure une possible toxicité cellulaire (Figure 31). Cette donnée est d'ailleurs confirmée par l'analyse de son effet pro-apoptotique par le marquage à l'annexine V (Planche 6). En effet, l'incubation des cellules avec le FCCP à 50 µM entraîne une augmentation de la proportion de cellules nécrotiques (fenêtre Upper Right) dans les différentes lignées (209%, 187%, 147% et 185% par rapport aux témoins pour HT29, Caco-2, HCT15 et HCT116), *versus* 122%, 111%, 104% et 114% respectivement, pour le sulfure de sulindac à 10^{-4}M.

Ainsi, le sulfure de sulindac à forte concentration est responsable d'un démasquage de l'épitope 7A6 à 18 h, et donc entraînerait la libération de cytochrome *c* par la mitochondrie.

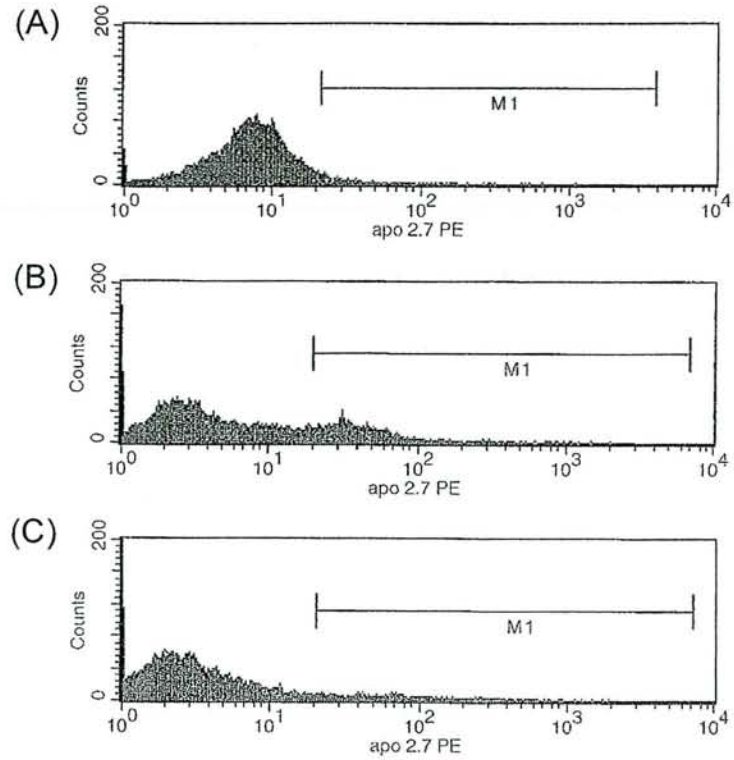


Planche 5 : Effet pro-apoptotique du sulfure de sulindac sur HT29 à 18h (APO2.7)
(A) Témoin (B) Sulfure de sulindac 10^{-4}M (C) FCCP 50 µM

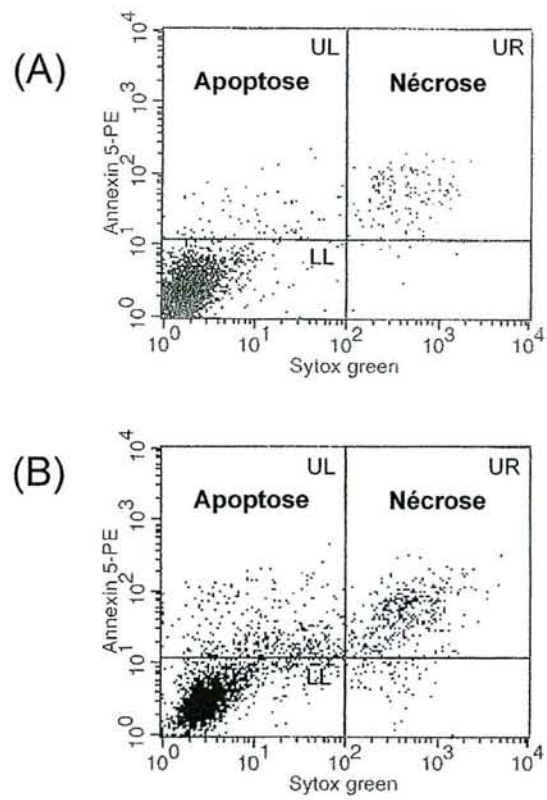


Planche 6 : Effet pro-apoptotique/nécrotique du FCCP 50 µM sur HT29 à 18h (annexine V)
(A) Témoin (B) FCCP 50 µM
LL : Low Left UL : Upper Left UR : Upper Right

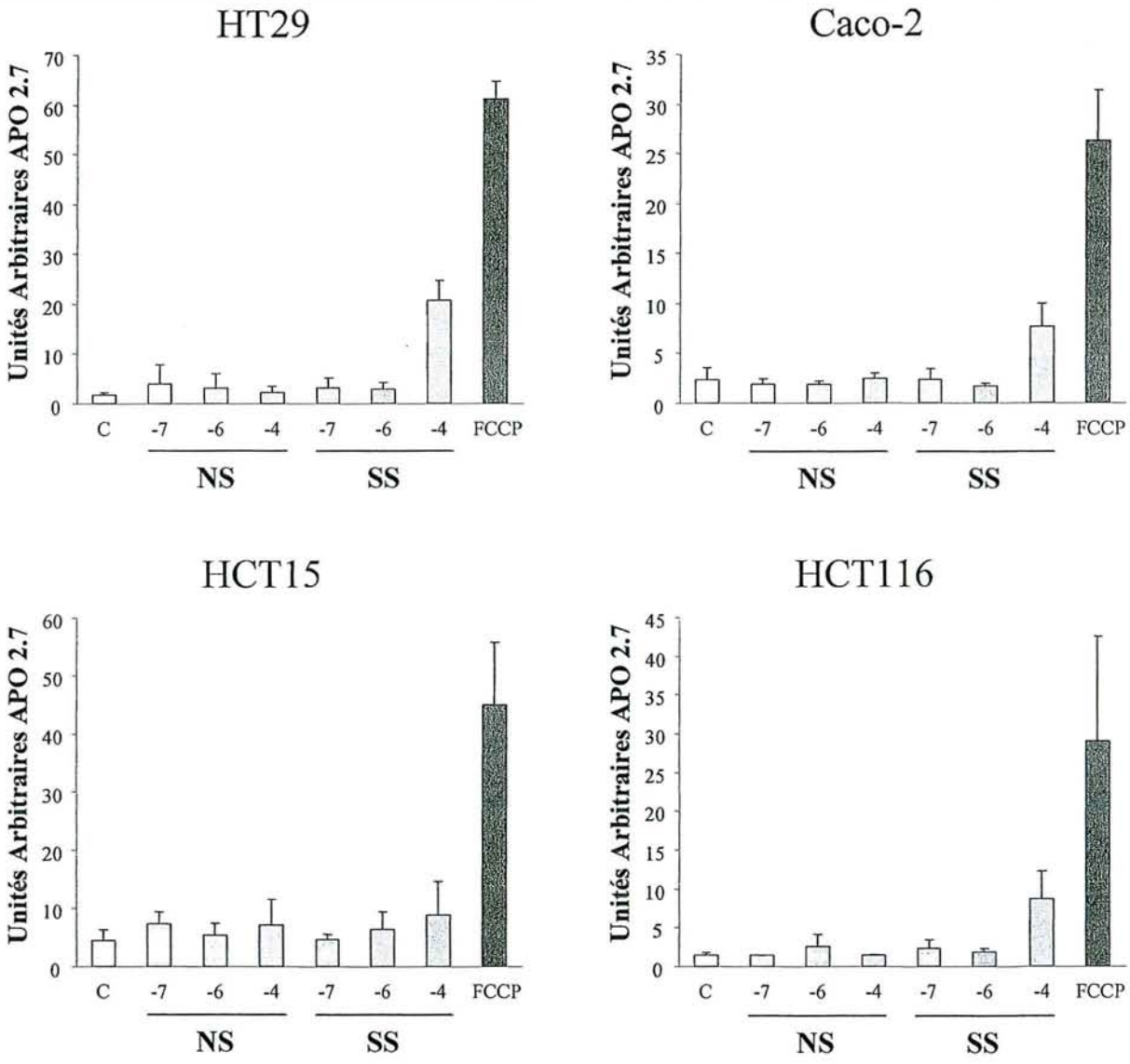


Figure 31 : Effets pro-apoptotiques du sulfure de sulindac et du NS-398 à 18H (APO2.7)
C : Témoin FCCP : FCCP 50 µM NS : NS-398 SS : Sulfure de sulindac
[concentrations exprimées en log (Dose)]

II.E.4. Effets des AINS sur la libération de protéines mitochondriales pro-apoptotiques

L'étude des effets mitochondriaux du sulfure de sulindac et du NS-398 a été complétée par l'évaluation de la libération dans le cytosol de protéines mitochondriales pro-apoptotiques, telles que le cytochrome *c* et la protéine Smac/DIABLO. Les deux AINS ont été testés à la concentration de 10^{-4}M, après 18 h d'incubation, temps déterminant d'après les expériences précédentes (Figure 32).

Le sulfure de sulindac à forte concentration, induit une libération de cytochrome *c* et de Smac/DIABLO dans toutes les lignées cellulaires de cancer colorectal. Par contre, le NS-398 n'entraîne aucune libération de ces protéines mitochondriales.

Les effets du FCCP sur la libération de Smac/DIABLO ont également été étudiés. Le FCCP à 7,5 µM entraîne, comme le sulfure de sulindac, une libération cytosolique de cette protéine dans les différentes lignées cellulaires, même si le signal est faible pour les cellules Caco-2 (Figure 32B).

Un prétraitement par la ciclosporine A à 1 µM réduit la libération de Smac/DIABLO par les deux agents dépolarisants dans la lignée HT29, et par le sulfure de sulindac dans les cellules HCT15 et HCT116. Aucun effet préventif n'est observé pour les cellules Caco-2 (Figure 32B)

II.E.5. Effets de la ciclosporine sur le dysfonctionnement mitochondrial induit par les AINS

Le prétraitement par la ciclosporine A à 1 µM prévient partiellement l'effet découpleur du sulfure de sulindac sur les cellules HT29, HCT15 et HCT116, puisque les valeurs en Low Right diminuent de 23.1 ± 8.4 à 10.3 ± 2.0, 24.1 ± 3.1 à 15.0 ± 1.2 et 18.0 ± 4.0 à 12.9 ± 0.7 respectivement (Figure 33). Aucune réduction significative n'est cependant observée pour les cellules Caco-2. Quelle soit la lignée, la ciclosporine A s'est montrée inefficace contre la dissipation du $\Delta\psi_m$ induite par le FCCP à 7,5 µM.

La ciclosporine A à 1 µM ayant prévenu la dissipation du $\Delta\psi_m$ dans trois de nos lignées de cancer colorectal exposées au sulfure de sulindac, ses effets sur l'apoptose induite par cet AINS ont également été étudiés. Une réduction partielle, mais significative, de la population des cellules en subG1 a été observée pour les lignées HT29 et HCT116 (Tableau XIX). Dans les lignées de cancer colorectal exposées au FCCP à 7,5 µM pendant 24 h, aucune augmentation du pourcentage de cellules en $subG_1$ n'est observée (Tableau XIX). Des doses de 10 et 20 µM de FCCP se sont également révélées inefficaces.

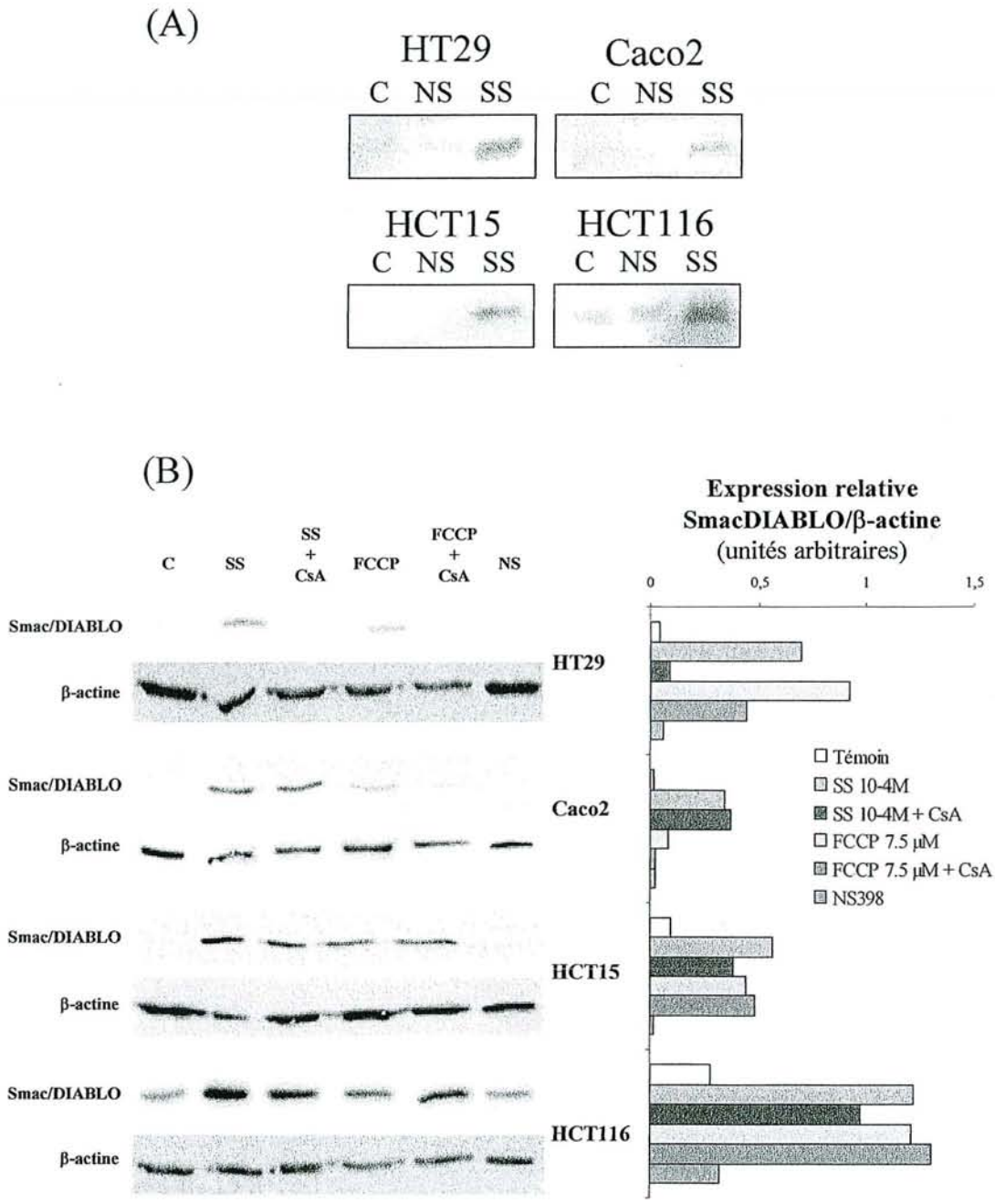


Figure 32 : Libération dans le cytosol de protéines mitochondriales pro-apoptotiques après incubation des cellules pendant 18 h avec les AINS.
(A) Cytochrome *c* (B) Smac/DIABLO
C : Témoins NS : NS-398 10^{-4}M SS : Sulfure de sulindac10^{-4}M

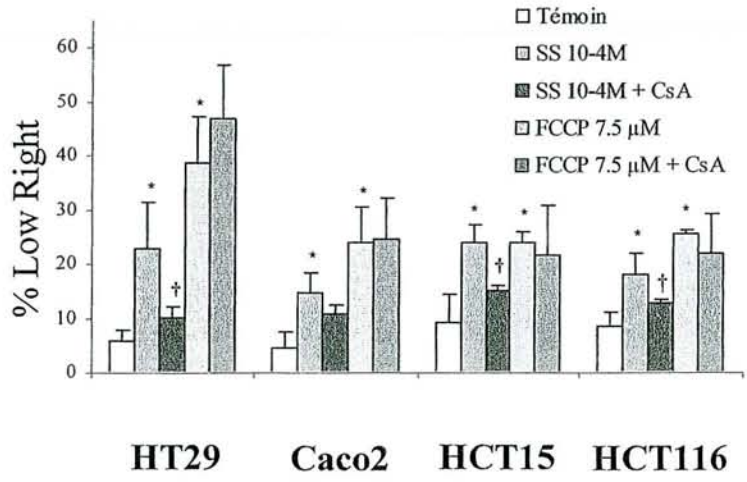


Figure 33 : Effets d'un prétraitement par la ciclosporine A (1 µM) sur la dissipation du $\Delta\psi_m$ induite par le sulfure de sulindac ou le FCCP
*: indique une différence significative par rapport aux témoins ($p<0.05$)
†: indique un effet significatif de la CsA ($p<0.05$)

Tableau XIX : Effets du FCCP 7,5 µM et d'un prétraitement par ciclosporine A (1 µM) sur l'apoptose des cellules de cancer colorectal (technique du subG1).

	Témoin	**SS 10^{-4}**	**SS 10^{-4} + CsA**	**FCCP 7.5**	**FCCP 7.5 + CsA**
HT29	3.3 ± 0.8	20.7 ± 2.0 *	14.1 ± 2.6 * †	3.4 ± 1.1	3.7 ± 0.2
Caco2	4.5 ± 1.3	26.8 ± 8.2 *	21.7 ± 5.8 *	7.9 ± 2.1	4.5 ± 1.2
HCT15	2.7 ± 1.9	37.8 ± 9.3 *	32.1 ± 7.5 *	6.4 ± 1.1	3.3 ± 1.8
HCT116	4.1 ± 1.7	26.1 ± 1.5 *	17.0 ± 4.3 * †	4.2 ± 3.2	4.7 ± 2.0

*: indique une différence significative par rapport aux témoins ($p<0.05$)
†: indique un effet significatif de la CsA ($p<0.05$)

III. DISCUSSION

La prévention du cancer colorectal par les anti-inflammatoires non stéroïdiens pouvant impliquer des mécanismes dépendants ou non des cyclo-oxygénases, nous avons étudié les effets de plusieurs AINS sur quatre lignées humaines de cancer colorectal, normalement différentes par leur statut COX.

La première phase de notre travail expérimental a porté sur la caractérisation de ces quatre lignées (HT29, Caco-2, HCT15 et HCT116), en termes de prolifération, de différenciation entérocytaire et d'expression des COXs.

L'étude des courbes de prolifération a montré que la phase exponentielle de croissance débute au troisième jour après la mise en culture, ce qui nous a permis de déterminer le jour optimal d'incubation avec les AINS. Comme le laissait supposer le nombre de passages faible de nos lignées et la formation de dômes modeste pour Caco-2 [Pinto et coll, 1983], l'activité phosphatase alcaline s'est révélée faible, ce qui indique que les lignées sont peu différenciées et ainsi, qu'elles présentent une certaine résistance aux traitements anticancéreux [Zweibaum, 1993]. L'analyse de l'expression des COXs par western blot a confirmé que les cellules HT29 et Caco-2 expriment les protéines COX-1 et COX-2, alors que HCT15 est négative pour les deux isoenzymes. Les lignées cellulaires ayant été adaptées à une concentration faible (5%) de sérum de veau fœtal dans le milieu de culture, l'expression de COX-2 est plus probablement constitutionnelle dans HT29 et Caco-2, plutôt que secondaire à une induction par les facteurs de croissance [Lee et coll, 1992]. L'absence d'expression des COXs dans HCT15 a confirmé qu'il s'agit d'un outil unique pour mettre en évidence les mécanismes d'action des AINS indépendants des COXs [Hanif et coll, 1996], même si ceci peut parfois dépendre des conditions expérimentales [Li et coll, 2001]. Une telle variation pourrait également avoir lieu avec HCT116, qui exprime COX-1 et COX-2 dans notre modèle de culture, mais qui a par ailleurs été utilisée comme lignée cellulaire négative pour COX-2 [Sheng et coll, 1997; Smith et coll, 2000a]. Cependant, dans une étude de régulation des gènes, il a été précédemment montré que COX-2 était exprimée de façon constitutionnelle dans ces cellules [Kutchera et coll, 1996].

Dans une deuxième phase, nous avons étudié les effets de différents AINS, qui ont été choisis d'après les critères suivants : chimioprévention supposée efficace d'après les études épidémiologiques (aspirine, sulindac), inhibition préférentielle de l'isoenzyme inductible des COXs (COX-2) (célécoxib, NS-398), propriétés physicochimiques très différentes pour une efficacité comparable dans des modèles animaux de cancer colorectal ou de polypose familiale (indométacine,

kétoprofène). Une étude comparative de ces AINS a tout d'abord été réalisée sur une large gamme de concentrations (10 nM à 1 mM) et pour une durée d'incubation variant de 24 h à 72 h, en utilisant le test au MTT. Ce test, qui met en évidence l'activité des déshydrogénases mitochondriales [Mosmann, 1983], reflète à la fois l'activité métabolique et la prolifération cellulaires. L'aspirine, l'indométacine et le kétoprofène à 1 mM, ainsi que les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (célécoxib, NS-398) et le sulfure de sulindac à 100 µM, inhibent le métabolisme cellulaire des quatre lignées de cancer colorectal, de façon plus ou moins prononcée selon le type cellulaire. A plus faible concentration, un effet antiprolifératif discret est observé de façon variable, selon l'AINS et la lignée étudiés, et après un temps d'incubation prolongé. Nous avons poursuivi l'étude des effets antiprolifératifs des AINS par une évaluation directe de la prolifération cellulaire (comptage). La concentration de 1 mM n'a pas été reprise pour l'aspirine, l'indométacine et le kétoprofène car, en plus d'être peu extrapolable aux conditions thérapeutiques d'utilisation de ces molécules (concentrations circulantes beaucoup plus faibles), les effets observés avec le test au MTT rendent compte plus probablement d'un phénomène de cytotoxicité directe [Subbegowda et Frommel, 1998]. La concentration maximale retenue a été 100 µM, qui semble plus pertinente d'un point de vue clinique, tout au moins pour le sulfure de sulindac, puisque des concentrations de l'ordre de 200 µM ont été décrites au niveau du tissu colique après des prises orales répétées de sulindac [Duggan et coll, 1980]. A cette concentration (100 µM), les effets antiprolifératifs de l'aspirine, l'indométacine et du kétoprofène ne sont pas retrouvés par la méthode de comptage. En revanche, le sulfure de sulindac et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (célécoxib, NS-398) inhibent de façon dose-dépendante la prolifération cellulaire des quatre lignées de cancer colorectal, ce qui est cohérent avec des études antérieures [Piazza et coll, 1995; Sheng et coll, 1997; Smith et coll, 2000a]. La dose-réponse obtenue avec le sulfure de sulindac est plus marquée qu'avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2. Une hypothèse serait que le plus grand pouvoir inhibiteur du sulfure de sulindac pourrait résulter d'une double inhibition de COX-1 et de COX-2, par rapport à une simple inhibition de COX-2 par le célécoxib et le NS-398. Cependant, une analyse détaillée des données suggère que l'inhibition des isoenzymes COX n'est pas suffisante pour rendre compte du blocage de la prolifération par les AINS puisque l'inhibition de la croissance cellulaire nécessite d'utiliser de fortes concentrations d'AINS, alors que la synthèse des prostaglandines est inhibée dès 1 µM dans les lignées colorectales humaines [Piazza et coll, 1997; Yamazaki et coll, 2002]. Le même phénomène a d'ailleurs été rapporté pour le sulfure de sulindac dans un modèle animal de carcinogenèse chimique [Charalambous et coll, 1998]. De plus, l'effet antiprolifératif du sulfure de sulindac n'est pas plus faible sur HCT15 que sur les lignées exprimant les cyclo-oxygénases.

Pour la thèse de Mikaël DAOUPHARS

IL N'Y A PAS DE PAGE 126

concentration utilisée. Une explication plausible pourrait être le temps choisi pour mesurer l'apoptose. En effet, l'effet pro-apoptotique rapporté pour le NS-398 après 48 h à 96 h d'incubation [Crew et coll, 2000], n'est pas retrouvé dans d'autres travaux lorsque l'analyse est effectuée après 24 h d'incubation [Yamazaki et coll, 2002]. De plus, l'effet pro-apoptotique du NS-398 dépend à la fois du niveau d'expression de COX-2 [Elder et coll, 1997] et des conditions de culture [Chang et Weng, 2001]. Par ailleurs, la comparaison de différents AINS sélectifs de COX-2 [Yamazaki et coll, 2002] suggère que les différentes molécules ne possèdent pas toutes le même potentiel pro-apoptotique et que, en particulier, le célécoxib se distingue par son fort pouvoir inducteur d'apoptose. Ceci pourrait faire intervenir des mécanismes indépendants des COXs, comme le blocage de l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt (Protéine Kinase B), régulatrice de la survie cellulaire, puisque ce mécanisme a été observé dans des cellules de cancer de la prostate incubées avec du célécoxib [Hsu et coll, 2000]. Cette inhibition de la phosphorylation de Akt/PKB serait liée à une inhibition, en amont, de la kinase PDK1 par le célécoxib [Arico et coll, 2002].

La mesure de l'activité des caspases 3/9 a confirmé les résultats obtenus avec la technique du pic subG$_1$. En effet, les lignées de cancer colorectal ont une activité basale comparable, qui est significativement augmentée par le sulfure de sulindac à 100 µM, mais qui n'est absolument pas affectée par le NS-398, quelle que soit la concentration étudiée. Dans ces conditions expérimentales, l'étoposide à 500 µM, molécule cytotoxique prise comme contrôle positif, augmente l'activité des caspases 3/9 beaucoup plus efficacement que le sulfure de sulindac. L'ensemble de ces résultats montre que les fortes concentrations de sulfure de sulindac ont un effet pro-apoptotique indépendant de l'inhibition des COXs, non retrouvé avec le NS-398, qui peut expliquer la supériorité de l'effet antiprolifératif de cette molécule. Que ce soit par la détection du pic subG$_1$ ou par la mesure de l'activité des caspases 3/9, l'indométacine n'a eu qu'un effet pro-apoptotique mineur aux concentrations étudiées. Une discordance entre les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques de l'indométacine *in vitro* a cependant été rapportée [Eli et coll, 2001]. Par ailleurs, l'induction de l'apoptose par l'indométacine est généralement observée de façon majeure, à des concentrations plus importantes (400 µM) et des temps d'observation plus tardifs (72 h) [Shiff et coll, 1996]. Pour des concentrations de l'ordre de 100 µM, l'indométacine se lie et induit l'activité transcriptionnelle des récepteurs associés aux proliférateurs de peroxysomes (PPARs) α et γ [Lehmann et coll, 1997]. Une expérience préliminaire (analyse du pic subG$_1$) avec des ligands des PPARs (WY 14643 pour PPARα, ciglitizone pour PPARγ [Forman et coll, 1996]), à des concentrations de 0,1 à 10 µM, n'a montré aucune variation du pourcentage d'apoptose. Ceci suggère que, dans nos conditions expérimentales, l'effet observé pour les fortes concentrations de sulfure de sulindac n'est probablement pas médié par une fixation sur les récepteurs PPAR γ, bien que ceux-ci soient

exprimés dans HT29 [Seed, 1998] et HCT116 [Hawcroft et coll, 2003]. Par contre, les effets antiprolifératifs du sulindac pourraient être liés à un effet antagoniste sur l'isotype PPARβ/δ, dont la liaison à l'ADN est inhibée par cette molécule dans des cellules de cancer colorectal [He et coll, 1999]. Ceci est d'autant plus important que cet isotype est sous la dépendance de la voie de signalisation wnt/APC/β-caténine : l'expression de PPARβ/δ est augmentée en présence de mutations sur le gène *APC* ou celui de la β-caténine [He et coll, 1999], qui représentent la majorité des mutations observées dans le cancer colorectal [Bienz et Clevers, 2000] et jouent un rôle majeur dans le processus de cancérogenèse [Lynch et de la Chapelle, 2003].

Compte tenu de la différence de structure chimique entre les AINS étudiés, acide indénylacétique pour le sulfure de sulindac et nitrophényl-méthanesulfonamide pour le NS-398, nous avons étudié leur capacité de modifier les fonctions mitochondriales sachant que : les mitochondries sont indispensables au maintien de l'énergétique cellulaire, leur dysfonctionnement pouvant être un élément initiateur de l'apoptose [Ferri et Kroemer, 2001] ; et que les AINS à fonction acide carboxylique peuvent se comporter comme des donneurs de protons vis-à-vis de la membrane mitochondriale [Mahmud et coll, 1996a] et provoquer un découplage de la phosphorylation oxydative par annulation du gradient électrochimique [Moreno-Sanchez et coll, 1999].

Le gradient électrochimique, qui joue un rôle essentiel dans la production d'ATP, dépend essentiellement du potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$). Différentes sondes fluorescentes peuvent refléter les changements au niveau du $\Delta\psi_m$, mais le colorant JC-1 est considéré comme plus fiable que le $DiOC_6$ (3,3'-dihexioxocarbocyanine iodide) ou la nonyl-acridine orange [Salvioli et coll, 1997]. Dans ce travail, nous avons démontré que le sulfure de sulindac induit une baisse du potentiel de membrane, indépendamment des COXs. Cette dissipation du $\Delta\psi_m$ apparaît dès 12 h après l'exposition des cellules au sulfure de sulindac à 100 µM, précédant ainsi l'induction de l'apoptose. D'une façon générale, les découpleurs de la phosphorylation oxydative sont également des inducteurs du complexe mitochondrial de transition de pore (PTM), et l'ouverture du pore peut en elle-même entraîner un découplage de la phosphorylation oxydative. Ceci nous a conduit à étudier les conséquences du blocage du PTM par la ciclosporine A, sur l'effet dépolarisant des AINS [Broekemeier et coll, 1989]. La dissipation du $\Delta\psi_m$ par le sulfure de sulindac est significativement diminuée par la ciclosporine A, indiquant ainsi que l'ouverture du PTM contribue au découplage. Cet effet pourrait impliquer la formation d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) pendant la respiration mitochondriale, comme cela a été démontré récemment pour l'ouverture du PTM dans des hépatocytes par le diclofénac [Gomez-Lechon et coll, 2003; Masubuchi et coll, 2002]. En accord avec ces données, le sulindac, l'indométacine et l'acide salicylique augmentent la génération

de ROS intracellulaires dans les cellules de cancer colorectal HT29 [Giardina et Inan, 1998; Tatebe et coll, 2002]. Par ailleurs, le sulfure de sulindac n'a montré que de faibles propriétés antiradicalaires par rapport au sulindac dans des modèles de production de EROs chimiquement induite [Fernandes et coll, 2003], alors qu'il sensibilise les cellules HT29 à l'apoptose induite par le déoxycholate sans réduire la formation de peroxynitrite [Washo-Stultz et coll, 2002]. Ainsi, une altération du métabolisme cellulaire des espèces réactives de l'oxygène pourrait participer à l'ouverture de pore induite par le sulfure de sulindac dans notre modèle, avec une contribution possible de la protéine Bax [Buccellato et coll, 2004]. *A contrario*, l'effet découpleur du protonophore FCCP, connu pour dissiper le gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne [Gunter et Pfeiffer, 1990], n'est pas affecté par un prétraitement avec la ciclosporine A. Ceci suggère que le FCCP entraîne une dépolarisation, et éventuellement un relarguage de calcium, indépendamment de la ciclosporine A, mécanisme décrit par certains auteurs comme une ouverture du pore mitochondrial « non classique » [Kanno et coll, 2002]. Une autre hypothèse serait que le FCCP surpasse l'effet inhibiteur de la ciclosporine A au niveau de l'ouverture de pore [Brustovetsky et Dubinsky, 2000]. Comme son absence de radical ionisable le laissait attendre, le NS-398 n'affecte pas le $\Delta\psi_m$, même à la plus forte concentration testée.

Enfin, nous avons recherché la libération dans le cytosol d'effecteurs mitochondriaux, comme le cytochrome *c* et Smac/DIABLO, pour établir un lien entre la perméabilisation de la membrane mitochondriale et l'apoptose. En effet, le cytochrome *c*, normalement stocké dans l'espace intermembranaire mitochondrial, est un activateur bien connu de « l'apoptosome » puisque son interaction avec Apaf-1 provoque l'oligomérisation de ce dernier, puis le recrutement de la pro-caspase 9 et son auto-activation, pour finalement provoquer l'activation de la caspase-3 [Budihardjo et coll, 1999]. Le sulfure de sulindac est responsable à 100 µM d'un démasquage de l'épitope mitochondrial 7A6, significatif après 18 h d'incubation, ce phénomène étant associé d'après certains travaux avec une libération de cytochrome *c* [Carthy et coll, 1999]. Nous avons ensuite confirmé ce résultat par western blot après séparation de la fraction cellulaire mitochondriale. Le sulfure de sulindac à 100 µM induit une libération de cytochrome *c* dans toutes les lignées, à la différence du NS-398. Cette libération est détectable à un temps d'incubation (18 h) cohérent avec la chute précoce du $\Delta\psi_m$ et l'apparition concomitante d'une externalisation des phosphatidylsérines, puis d'une fragmentation nucléaire. Ces résultats complètent ceux d'une précédente étude sur la libération du cytochrome *c* par le sulfure de sulindac [Bauvy et coll, 2001]. Une autre voie par laquelle des protéines d'origine mitochondriale peuvent promouvoir l'apoptose, est l'inactivation de ses inhibiteurs naturels. Cette propriété est bien établie pour Smac/DIABLO, protéine synthétisée dans le cytoplasme sous la forme d'un précurseur qui possède une séquence d'adressage spécifique

de la membrane mitochondriale. Après importation, cette séquence est clivée dans l'espace intermembranaire pour générer un peptide de 23 kDa qui est stocké dans la membrane mitochondriale mais peut favoriser l'apoptose en inhibant certains inhibiteurs naturels des caspases (IAPs, « Inhibitor-of-Apoptosis Proteins ») dans le cytosol [Verhagen et coll, 2000]. De façon cohérente avec sa transformation membranaire consécutive de la baisse du $\Delta\psi_m$ [Tillman et coll, 2003], Smac/DIABLO est détecté dans le cytosol des cellules exposées au sulfure de sulindac ou au FCCP, mais pas au NS-398. De plus, la ciclosporine A diminue la libération de Smac/DIABLO induite par le sulfure de sulindac, sauf dans la lignée Caco-2, mais reste inefficace vis-à-vis de celle induite par le FCCP. L'ensemble de ces données suggère que la dissipation du $\Delta\psi_m$ induite par les découpleurs est associée à une ouverture du complexe mitochondrial de transition de pore et à la perméabilisation mitochondriale qui en résulte, entraînant la libération de Smac/DIABLO. Un tel mécanisme n'a pas été rapporté jusqu'à présent en réponse aux AINS ou au FCCP dans des cellules cancéreuses, même si une cascade similaire a été décrite récemment avec la rottlerine, découpleur mitochondrial [Tillman et coll, 2003]. Le mécanisme par lequel la chute du $\Delta\psi_m$ induit la libération de cytochrome *c* et de Smac/DIABLO pourrait impliquer la protéine Bax [Kandasamy et coll, 2003], connue pour s'ancrer dans la membrane mitochondriale en réponse à une chute du potentiel transmembranaire [Smaili et coll, 2001]. En effet, il a été démontré que l'expression de Bax régule la réponse apoptotique au sulfure de sulindac dans les cellules cancéreuses [Zhang et coll, 2000], tout en étant elle-même stimulée par les AINS [Aggarwal et coll, 2000].

Dans de nombreux types cellulaires, la libération de Smac/DIABLO dans le cytosol précède l'activation des caspases et les signes biologiques de l'apoptose [Ferri et Kroemer, 2001]. Dans nos conditions expérimentales, la dissipation du $\Delta\psi_m$ et la libération de Smac/DIABLO apparaissent avant la fragmentation de l'ADN en réponse à 100 µM de sulfure de sulindac. Cependant, nos données ne sont pas en faveur d'un rôle majeur d'un dysfonctionnement mitochondrial dans le processus apoptotique. Premièrement, la prévention de la perméabilisation mitochondriale par la ciclosporine A à 1 µM résulte en une réduction modérée de l'apoptose induite par le sulfure de sulindac (de 16% pour HCT15 à 41% pour HCT116). Deuxièmement, le FCCP n'est pas capable d'induire de l'apoptose à des doses pourtant responsables d'un effet découpleur majeur dans toutes les lignées de cancer colorectal. Dans nos conditions expérimentales (SVF 5%), ce manque d'efficacité ne résulte probablement pas d'une inactivation du FCCP par liaison aux protéines, puisqu'il a été montré que l'induction d'apoptose est retardée, plus que supprimée, par une concentration plus importante de SVF dans le milieu de culture [Stoetzer et coll, 2002]. Comme des concentrations similaires de FCCP induisent l'apoptose de cellules d'origine lymphoïde, myéloïde ou neuronale [Stoetzer et coll, 2002], nos résultats suggèrent que les cellules colorectales pourraient

avoir développé des mécanismes de protection, ou que l'apoptose est influencée différemment par le PTM, en fonction de sa sensibilité à la ciclosporine A. En effet, bien qu'entraînant une chute du $\Delta\psi_m$, le FCCP est incapable d'induire la translocation de Bax si le taux d'ATP intracellulaire n'est pas maintenu à un niveau suffisant [Smaili et coll, 2001]. De plus, le découpleur rottlerine intervient plutôt dans la sensibilisation des cellules colorectales aux signaux apoptotiques, que dans l'induction d'apoptose proprement dite [Tillman et coll, 2003]. Troisièmement, la libération de Smac/DIABLO est comparable pour le sulfure de sulindac et le FCCP, en dépit d'une différence majeure dans leur capacité à induire l'apoptose. Ce résultat suggère que Smac/DIABLO ne joue pas un rôle essentiel dans la réponse apoptotique des cellules de cancer colorectal aux découpleurs, et que des mécanismes supplémentaires existent pour le sulfure de sulindac. Cette hypothèse est par ailleurs soutenue par l'incapacité d'une translocation de Smac/DIABLO dans le cytosol, à médier l'apoptose dans des cellules de carcinome pulmonaire exposées à l'étoposide [Bartling et coll, 2004]. Enfin, les fibroblastes de souris déficientes en Smac/DIABLO répondent normalement à des stimuli apoptotiques variés, tels que l'irradiation aux UV et l'exposition à des molécules anticancéreuses ou au TNF [Okada et coll, 2002].

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le premier objectif de ce travail était de comparer les effets sur la prolifération cellulaire et l'apoptose d'AINS ayant des profils de sélectivité différents vis-à-vis des isoenzymes de la COX, sur des lignées humaines de cancer colorectal, elles-mêmes différentes par leur statut COX. Dans un premier temps, nous avons caractérisé nos différentes lignées cellulaires en termes de prolifération et de statut COX. Ceci a confirmé la pertinence du choix des quatre lignées, qui nous ont permis de disposer de cellules colorectales exprimant ou non les COXs. Nous avons montré que les AINS à forte concentration, 10^{-4}M, voire 10^{-3}M, sont responsables d'une inhibition de la croissance cellulaire. Ces effets sont particulièrement marqués avec le sulfure de sulindac et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (célécoxib, NS-398), et sont observés sur toutes les lignées cellulaires. Nous avons montré que l'inhibition de la prolifération cellulaire par les AINS est liée à leurs effets sur le cycle cellulaire et l'apoptose. En effet, le sulfure de sulindac et le NS-398, choisi pour la suite de notre travail expérimental, entraînent un blocage du cycle cellulaire en phase G_1, à forte concentration (10^{-4}M), et cet effet est moins marqué dans la lignée HCT15 qui n'exprime pas les COXs. Par ailleurs, nos résultats montrent que le sulfure de sulindac induit la mort cellulaire programmée de toutes les lignées de cancer colorectal, à forte concentration. Cet effet pro-apoptotique n'est pas observé avec le NS-398. Cette différence entre le NS-398 et le sulfure de sulindac explique probablement l'inhibition de la prolifération cellulaire plus marquée avec ce dernier.

Le deuxième objectif de ce travail était de mettre en évidence les mécanismes impliqués, en étudiant la contribution de l'inhibition des COXs dans les effets des AINS. Les résultats obtenus sur l'inhibition de la prolifération cellulaire, le blocage du cycle en phase G_1 et l'induction de l'apoptose par les AINS suggèrent la participation de mécanismes COX-dépendants et indépendants, et montrent l'absence de lien entre la sélectivité des AINS pour COX-2 et leurs effets antiprolifératifs et/ou pro-apoptotiques. Compte tenu de la différence de structure chimique entre le sulfure de sulindac et le NS-398, et que les effets observés le soient à forte concentration, nous avons décidé d'étudier les effets des AINS sur le découplage de la phosphorylation oxydative. Nous avons montré que le sulfure de sulindac, au contraire du NS-398, entraîne une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, et ce, indépendamment des COXs. Cet effet découpleur entraîne l'ouverture du pore de transition mitocondrial et déclenche la libération de protéines mitochondriales pro-apoptotiques telles que le cytochrome *c* et Smac/DIABLO, entraînant l'activation de la cascade des caspases 3/9 que nous avons également observée. Ces résultats mettent en évidence un nouveau mécanisme d'action susceptible de contribuer en partie, aux effets antiprolifératifs très importants du sulfure de sulindac, à la fois *in vitro* et au niveau des tissus

intestinal et colique. En effet, à la différence d'autres AINS, les résultats obtenus à 10^{-4}M avec le sulfure de sulindac sont compatibles avec les concentrations utilisées en clinique et les effets observés sur la polypose familiale. Ce découplage de la phosphorylation oxydative a par ailleurs été impliqué dans la genèse des effets indésirables gastro-intestinaux des AINS classiques, en entraînant une toxicité locale [Somasundaram et coll, 1995; Somasundaram et coll, 2000].

Parmi les nombreuses perspectives envisageables, il serait intéressant dans un premier temps, d'explorer plus précisément les mécanismes d'action pro-apoptotiques du sulfure de sulindac dans notre modèle expérimental, notamment par la recherche du rôle régulateur de la protéine Bax sur les effets observés. Par ailleurs, l'étude séparée de l'activité ou de l'expression des caspases 3 et 9 permettrait de distinguer les contributions respectives du cytochrome *c* et de Smac/DIABLO dans l'effet pro-apoptotique de cette molécule.

Cependant, l'activation modérée de la voie des caspases, ainsi que la participation seulement partielle de l'effet découpleur sur l'apoptose induite par le sulfure de sulindac dans nos conditions expérimentales, suggèrent l'existence d'autres mécanismes d'action possibles pour cette molécule, pour laquelle de nombreuses hypothèses sont formulées dans la littérature scientifique. En particulier, il serait intéressant d'étudier dans un deuxième temps, les effets du sulindac sur la voie de signalisation wnt/β-caténine, qui est activée dans près de 85% des formes sporadiques de carcinome colorectal [Huls et coll, 2003] et constitue un système de régulation essentiel des processus de prolifération et de différenciation cellulaires. En effet, il a été montré par analyse génomique de biopsies rectales et lignées coliques, que le sulindac pouvait favoriser la surexpression de p21 [Yang et coll, 2001], elle-même associée *in vitro* à un arrêt du cycle cellulaire et une initiation du processus apoptotique [Goldberg et coll, 1996]. Une diminution de la cycline D1 a également été rapportée chez des cellules exposées au sulindac, qu'il s'agisse des métabolites sulfure [DuBois et coll, 1996] ou sulfone [Li et coll, 2002]. Sachant que la protéine p21 et la cycline D1 sont régulées, bien qu'en sens inverse, par la β-caténine via le facteur de transcription TCF4 [Tetsu et McCormick, 1999; van de Wetering et coll, 2002], on peut supposer que les métabolites du sulindac seraient capables de diminuer l'expression de la β-caténine [Rice et coll, 2003] ou la fonctionnalité du complexe β-caténine/APC/GSK-3β. Dans les cellules normales, la β-caténine cytosolique libre est rapidement phosphorylée au sein d'un complexe comprenant APC et la GSK-3β (glycogen synthase kinase 3-β) [Polakis et coll, 1999]. Cette phosphorylation permet l'ubiquitination de la β-caténine, et sa dégradation par le protéasome [Aberle et coll, 1997]. De plus, le sulfure de sulindac agit comme antagoniste PPARβ/δ, dont l'expression est également régulée négativement par la β-caténine [He et coll, 1999]. D'ailleurs, d'autres AINS, comme l'indométacine

entraînent dans différentes lignées de cancer colorectal, une inhibition de la voie de signalisation β-caténine/TCF par l'intermédiaire d'une stabilisation de la forme phosphorylée de la β-caténine [Dihlmann et coll, 2003]. Les résultats précédents n'excluent pas bien évidemment l'existence d'autres mécanismes pour expliquer les effets antiprolifératifs et/ou pro-apoptotiques des AINS, comme la voie des céramides, se formant lors de l'accumulation d'acide arachidonique secondaire à l'inhibition des COXs, et intervenant dans la voie de signalisation de NF-κB [Chan et coll, 1998]. De même, il existe des spécificités propres à une molécule donnée au sein d'une classe pharmacologique, comme par exemple le célécoxib, seul inhibiteur sélectif de COX-2 capable d'inhiber la voie Akt [Arico et coll, 2002; Hsu et coll, 2000], ou l'aspirine qui conduit à la formation d'épilipoxines, via un métabolisme transcellulaire impliquant les lipoxygénases [Claria et Serhan, 1995; Marcus, 1995]. Ces métabolites pourraient avoir des propriétés antiprolifératives, notamment par un effet antiangiogénique [Fierro et coll, 2002]. On peut également souligner que l'aspirine et le sulindac, mais pas l'indométacine, sont enfin capables d'inhiber l'activité de IKKβ (IκB kinase), ce qui réduit la phosphorylation et la dégradation d'IκB par le protéasome, empêchant ainsi la translocation de NF-κB vers le noyau et l'activation de cette voie [Grilli et coll, 1996; Kopp et Ghosh, 1994; Yamamoto et coll, 1999; Yin et coll, 1998]. La multiplicité des mécanismes d'action de l'aspirine pourrait notamment expliquer les études épidémiologiques récentes suggérant des propriétés chimiopréventives dans la population générale, dès ses faibles posologies antithrombotiques [Baron et coll, 2003; Sandler et coll, 2003].

Il serait également important d'étudier plus précisément les dysfonctionnements mitochondriaux induits par le sulfure de sulindac. L'effet de cette molécule sur la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène, qui sont capables d'activer la voie pro-apoptotique mitochondriale [Chung et coll, 2003; Giardina et Inan, 1998; Kroemer et Reed, 2000] semble particulièrement intéressante, d'autant que les AINS peuvent augmenter le stress oxydatif via la voie des pentoses phosphates, en inhibant l'activité de la G6PDH, donc la production de la forme réduite protectrice de NADPH [Porter et coll, 2000].

Enfin, il serait intéressant d'étudier les effets antiprolifératifs d'autres AINS carboxyliques par rapport à leur effet découpleur. En effet, ce dernier dépend des propriétés physicochimiques des AINS, et serait en particulier inversement proportionnel au pKa, lié à la fonction acide [Mahmud et coll, 1996a]. Ceci permettrait de vérifier si l'induction d'un dysfonctionnement mitochondrial serait un atout des AINS possédant une fonction acide, même si les concentrations locales d'AINS sont probablement un élément critique dans le fait que cet effet découpleur joue un rôle plus ou moins important. A ce titre, le sulindac fait figure d'exemple : des concentrations importantes du dérivé

sulfure, jusqu'à 20 fois supérieures aux concentrations sériques (10-15 µM) [Duggan et coll, 1977; Waddell et coll, 1989], sont retrouvées au niveau du colon, notamment grâce au cycle entérohépatique de la prodrogue, qui peut être métabolisée *in situ* par la flore bactérienne colique [Strong et coll, 1985]. Par ailleurs, des concentrations intracellulaires importantes du sulfure sont attendues dans ce tissu, puisque son pKa élevé (7,4) lui permet d'être présent majoritairement sous forme non ionisée au pH colique (7 à 8) [Labaune, 1988], facilitant ainsi son absorption par diffusion passive.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., et Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*, **16**, 3797-3804.

Abramson, S. B., et Weissmann, G. (1989). The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum*, **32**, 1-9.

Adie, E. J., Mullaney, I., McKenzie, F. R., et Milligan, G. (1992). 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*, **285 (Pt 2)**, 529-536.

Agarwal, B., Rao, C. V., Bhendwal, S., Ramey, W. R., Shirin, H., Reddy, B. S., et Holt, P. R. (1999). Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. *Gastroenterology*, **117**, 838-847.

Aggarwal, S., Taneja, N., Lin, L., Orringer, M. B., Rehemtulla, A., et Beer, D. G. (2000). Indomethacin-induced apoptosis in esophageal adenocarcinoma cells involves upregulation of Bax and translocation of mitochondrial cytochrome C independent of COX-2 expression. *Neoplasia*, **2**, 346-356.

Allee, P. E., Tepper, J. E., Gunderson, L. L., et Munzenrider, J. E. (1989). Postoperative radiation therapy for incompletely resected colorectal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **17**, 1171-1176.

Appleby, S. B., Ristimaki, A., Neilson, K., Narko, K., et Hla, T. (1994). Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J*, **302 (Pt 3)**, 723-727.

Arico, S., Pattingre, S., Bauvy, C., Gane, P., Barbat, A., Codogno, P., et Ogier-Denis, E. (2002). Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem*, **277**, 27613-27621.

Astler, V., et Coller, F. (1954). The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg (Philadelphia)*, **139**, 846-852.

Baliga, B. C., et Kumar, S. (2002). Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematol Oncol*, **20**, 63-74.

Bansal, P., et Sonnenberg, A. (1996). Risk factors of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, **91**, 44-48.

Baron, J. A., Cole, B. F., Sandler, R. S., Haile, R. W., Ahnen, D., Bresalier, R., McKeown-Eyssen, G., Summers, R. W., Rothstein, R., Burke, C. A., et coll (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med*, **348**, 891-899.

Bartling, B., Lewensohn, R., et Zhivotovsky, B. (2004). Endogenously released Smac is insufficient to mediate cell death of human lung carcinoma in response to etoposide. *Exp Cell Res*, **298**, 83-95.

Bauvy, C., Gane, P., Arico, S., Codogno, P., et Ogier-Denis, E. (2001). Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Exp Cell Res*, **268**, 139-149.

Belch, J. J. (1989). Eicosanoids and rheumatology: inflammatory and vascular aspects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **36**, 219-234.

Bennett, A., et Del Tacca, M. (1975). Proceedings: Prostaglandins in human colonic carcinoma. *Gut*, **16**, 409.

Bergstrom, S., Danielsson, H., et Samuelsson, B. (1964). The enzymatic formation of PGE2 from arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta*, **90**, 207-210.

Bienz, M., et Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, **103**, 311-320.

Blake, C. (1994). Prostaglandin synthase. At the heart of the matter. *Curr Biol*, **4**, 452-454.

Blanco, F. J., et Lotz, M. (1995). IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. *Exp Cell Res*, **218**, 319-325.

Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., et Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*, **270**, 7795-7798.

Boolbol, S. K., Dannenberg, A. J., Chadburn, A., Martucci, C., Guo, X. J., Ramonetti, J. T., Abreu-Goris, M., Newmark, H. L., Lipkin, M. L., DeCosse, J. J., et Bertagnolli, M. M. (1996). Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res*, **56**, 2556-2560.

Bossy-Wetzel, E., Bakiri, L., et Yaniv, M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *Embo J*, **16**, 1695-1709.

Botting, R. M. (2000). Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis*, **31 Suppl 5**, S202-210.

Boyle, P., et Leon, M. E. (2002). Epidemiology of colorectal cancer. *Br Med Bull*, **64**, 1-25.

Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauca, M., et Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, **137**, 354-366.

Breuer-Katschinski, B., Nemes, K., Rump, B., Leiendecker, B., Marr, A., Breuer, N., et Goebell, H. (2000). Long-term use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of colorectal adenomas. The Colorectal Adenoma Study Group. *Digestion*, **61**, 129-134.

Broekemeier, K. M., Dempsey, M. E., et Pfeiffer, D. R. (1989). Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem*, **264**, 7826-7830.

Brustovetsky, N., et Dubinsky, J. M. (2000). Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. *J Neurosci*, **20**, 8229-8237.

Buccellato, L. J., Tso, M., Akinci, O. I., Chandel, N. S., et Budinger, G. R. (2004). Reactive oxygen species are required for hyperoxia-induced Bax activation and cell death in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*, **279**, 6753-6760.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., et Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 269-290.

Cain, K., Bratton, S. B., et Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, **84**, 203-214.

Calaluce, R., Earnest, D. L., Heddens, D., Einspahr, J. G., Roe, D., Bogert, C. L., Marshall, J. R., et Alberts, D. S. (2000). Effects of piroxicam on prostaglandin E2 levels in rectal mucosa of adenomatous polyp patients: a randomized phase IIb trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 1287-1292.

Carbone, P. P., Douglas, J. A., Larson, P. O., Verma, A. K., Blair, I. A., Pomplun, M., et Tutsch, K. D. (1998). Phase I chemoprevention study of piroxicam and alpha-difluoromethylornithine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **7**, 907-912.

Carthy, C. M., Granville, D. J., Jiang, H., Levy, J. G., Rudin, C. M., Thompson, C. B., McManus, B. M., et Hunt, D. W. C. (1999). Early release of mitochondrial cytochrome c and expression of mitochondrial epitope 7A6 with a prophyrin-derived photosensitizer: bcl-2 and bcl-XL overexpression do not prevent early mitochondrial events but still depress activity. *Laboratory Investigation*, **79**, 953-965.

Chai, J., Du, C., Wu, J. W., Kyin, S., Wang, X., et Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, **406**, 855-862.

Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., et Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, **288**, 2351-2354.

Chan, T. A., Morin, P. J., Vogelstein, B., et Kinzler, K. W. (1998). Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 681-686.

Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., et Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13926-13931.

Chang, H. C., et Weng, C. F. (2001). Cyclooxygenase-2 level and culture conditions influence NS398-induced apoptosis and caspase activation in lung cancer cells. *Oncol Rep*, **8**, 1321-1325.

Chang, H. Y., et Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 821-846.

Charalambous, D., Skinner, S. A., et O'Brien, P. E. (1998). Sulindac inhibits colorectal tumour growth, but not prostaglandin synthesis in the rat. *J Gastroenterol Hepatol*, **13**, 1195-1200.

Chawla, A., Schwarz, E. J., Dimaculangan, D. D., et Lazar, M. A. (1994). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*, **135**, 798-800.

Cheng, J., Imanishi, H., Amuro, Y., et Hada, T. (2002). NS-398, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, inhibited cell growth and induced cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, **99**, 755-761.

Chinnaiyan, A. M., Chaudhary, D., O'Rourke, K., Koonin, E. V., et Dixit, V. M. (1997a). Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature*, **388**, 728-729.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R., et Dixit, V. M. (1997b). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*, **275**, 1122-1126.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., et Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, **81**, 505-512.

Chow, H. H., Earnest, D. L., Clark, D., Mason-Liddil, N., Kramer, C. B., Einspahr, J. G., Guillen-Rodriguez, J. M., Roe, D. J., Malone, W., Crowell, J. A., et Alberts, D. S. (2000). Effect of subacute ibuprofen dosing on rectal mucosal prostaglandin E2 levels in healthy subjects with a history of resected polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 351-356.

Chung, Y. M., Bae, Y. S., et Lee, S. Y. (2003). Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med*, **34**, 434-442.

Claria, J., et Serhan, C. N. (1995). Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9475-9479.

Cochrane, D. J., Jarvis, B., et Keating, G. M. (2002). Etoricoxib. *Drugs*, **62**, 2637-2651; discussion 2652-2633.

Cohen, B. I., Raicht, R. F., Deschner, E. E., Takahashi, M., Sarwal, A. N., et Fazzini, E. (1980). Effect of cholic acid feeding on N-methyl-N-nitrosourea-induced colon tumors and cell kinetics in rats. *J Natl Cancer Inst*, **64**, 573-578.

Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **326 (Pt 1)**, 1-16.

Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., et Golub, T. R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3260-3265.

Collet, J. P., Sharpe, C., Belzile, E., Boivin, J. F., Hanley, J., et Abenhaim, L. (1999). Colorectal cancer prevention by non-steroidal anti-inflammatory drugs: effects of dosage and timing. *Br J Cancer*, **81**, 62-68.

Conroy, T., et Adenis, A. (1998). [Standards, Options, and Recommendations for the surveillance after treatment in cancer of the colon. The SOR Working Group "Cancer du Colon" de la Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer]. *Bull Cancer*, **85**, 152-159.

Coogan, P. F., Rosenberg, L., Louik, C., Zauber, A. G., Stolley, P. D., Strom, B. L., et Shapiro, S. (2000). NSAIDs and risk of colorectal cancer according to presence or absence of family history of the disease. *Cancer Causes Control*, **11**, 249-255.

Crew, T. E., Elder, D. J. E., et Paraskeva, C. (2000). A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal antiinflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate. *Carcinogenesis*, **21**, 69-77.

Cronstein, B., et Weissmann, G. (1995). Target for anti-inflammatory drugs. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **35**, 449-462.

Cryer, B., et Feldman, M. (1998). Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, **104**, 413-421.

Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., et Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, **13**, 795-808.

Davies, N. M., et Watson, M. S. (1997). Clinical pharmacokinetics of sulindac. A dynamic old drug. *Clin Pharmacokinet*, **32**, 437-459.

Davis, R., et Brogden, R. N. (1994). Nimesulide. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*, **48**, 431-454.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., et Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 891-901.

Deschner, E. E., Cohen, B. I., et Raicht, R. F. (1981). Acute and chronic effect of dietary cholic acid on colonic epithelial cell proliferation. *Digestion*, **21**, 290-296.

Despré, A., Jambut-Absil, A. C., Javerliat, M., et Bruxeraud, J. (1989). Les prostaglandines : utilisations thérapeutiques. *Actualités Pharmaceutiques*, **264**, 35-40.

Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J., et Wahli, W. (1996). The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, **384**, 39-43.

Deveraux, Q. L., et Reed, J. C. (1999). IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 239-252.

DeWitt, D. (1999). Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol*, **55**, 625-631.

DeWitt, D. L., el-Harith, E. A., Kraemer, S. A., Andrews, M. J., Yao, E. F., Armstrong, R. L., et Smith, W. L. (1990). The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J Biol Chem*, **265**, 5192-5198.

DeWitt, D. L., et Smith, W. L. (1988). Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 1412-1416.

Di Battista, J. A., Dore, S., Martel-Pelletier, J., et Pelletier, J. P. (1996). Prostaglandin E2 stimulates incorporation of proline into collagenase digestible proteins in human articular chondrocytes: identification of an effector autocrine loop involving insulin-like growth factor I. *Mol Cell Endocrinol*, **123**, 27-35.

Dihlmann, S., Klein, S., et Doeberitz Mv, M. K. (2003). Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol Cancer Ther*, **2**, 509-516.

Ding, C., et Jones, G. (2002). Lumiracoxib (novartis). *Idrugs*, **5**, 1168-1172.

DuBois, R. N., Shao, J., Tsujii, M., Sheng, H., et Beauchamp, R. D. (1996). G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res*, **56**, 733-737.

Duggan, D. E., Hare, L. E., Ditzler, C. A., Lei, B. W., et Kwan, K. C. (1977). The disposition of sulindac. *Clin Pharmacol Ther*, **21**, 326-335.

Duggan, D. E., Hooke, K. F., et Hwang, S. S. (1980). Kinetics of the tissue distributions of sulindac and metabolites. Relevance to sites and rates of bioactivation. *Drug Metab Dispos*, **8**, 241-246.

Duggan, D. E., Hooke, K. F., Noll, R. M., Hucker, H. B., et Van Arman, C. G. (1978). Comparative disposition of sulindac and metabolites in five species. *Biochem Pharmacol*, **27**, 2311-2320.

Duvall, E., et Wyllie, A. H. (1986). Death and the cell. *Immunol Today*, 115-119.

Earnest, D. L., Holubec, H., Wali, R. K., Jolley, C. S., Bissonette, M., Bhattacharyya, A. K., Roy, H., Khare, S., et Brasitus, T. A. (1994). Chemoprevention of azoxymethane-induced colonic carcinogenesis by supplemental dietary ursodeoxycholic acid. *Cancer Res*, **54**, 5071-5074.

Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S., et DuBois, R. N. (1994). Up-regulation of Cyclooxygenase 2 Gene Expression in Human Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas. *Gastroenterology*, **107**, 1183-1188.

Eberhart, C. E., et Dubois, R. N. (1995). Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, **109**, 285-301.

Ehrich, E. W., Schnitzer, T. J., McIlwain, H., Levy, R., Wolfe, F., Weisman, M., Zeng, Q., Morrison, B., Bolognese, J., Seidenberg, B., et Gertz, B. J. (1999). 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*, **26**, 2438-2447.

Eklund, B., et Carlson, L. A. (1980). Central and peripheral circulatory effects and metabolic effects of different prostaglandins given I.V. to man. *Prostaglandins*, **20**, 333-347.

Elder, D. J., Halton, D. E., Hague, A., et Paraskeva, C. (1997). Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res*, **3**, 1679-1683.

Eli, Y., Przedecki, F., Levin, G., Kariv, N., et Raz, A. (2001). Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*, **61**, 565-571.

Elstein, K. H., et Zucker, R. M. (1994). Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. *Exp Cell Res*, **211**, 322-331.

Elstner, E., Muller, C., Koshizuka, K., Williamson, E. A., Park, D., Asou, H., Shintaku, P., Said, J. W., Heber, D., et Koeffler, H. P. (1998). Ligands for peroxisome proliferator-activated receptorgamma 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*, **95**, 8806-8811.

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., et Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, **20**, 929-935.

Evan, G. I., Brown, L., Whyte, M., et Harrington, E. (1995). Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 825-834.

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., et Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, **148**, 2207-2216.

Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A. M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J. C., Deeb, S., et coll (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, **272**, 18779-18789.

Fearon, E. R., et Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-767.

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

Fernandes, E., Toste, S. A., Lima, J. L., et Reis, S. (2003). The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med*, **35**, 1008-1017.

Ferreira, S. H., et Vane, J. R. (1967). Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature*, **216**, 868-873.

Ferri, K. F., et Kroemer, G. (2001). Mitochondria-the suicide organelles. *Bioessays*, **23**, 111-115.

Fierro, I. M., Kutok, J. L., et Serhan, C. N. (2002). Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15R-lipoxin A(4) and lipoxin A(4). *J Pharmacol Exp Ther*, **300**, 385-392.

Fisher, J. W. (1980). Mechanism of the anemia of chronic renal failure. *Nephron*, **25**, 106-111.

Fitzgerald, G. A. (2004). Coxibs and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.*

Flower, R. J., et Vane, J. R. (1972). Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature*, **240**, 410-411.

Forman, B. M., Chen, J., et Evans, R. M. (1996). The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann N Y Acad Sci*, **804**, 266-275.

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

Frölich, J. (1997). A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci*, **18**, 30-34.

Fukuda, K., Ohtani, K., Dan, H., et Tanaka, S. (1995). Interleukin-1 inhibits keratan sulfate production by rabbit chondrocytes: possible role of prostaglandin E2. *Inflamm Res*, **44**, 178-181.

Fulkerson, J. P., et Damiano, P. (1983). Effect of prostaglandin E2 on adult pig articular cartilage slices in culture. *Clin Orthop*, 266-269.

Funk, C. D., Funk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S., et Fitzgerald, G. A. (1991). Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *Faseb J*, **5**, 2304-2312.

Funk, C. D., Furci, L., FitzGerald, G. A., Grygorczyk, R., Rochette, C., Bayne, M. A., Abramovitz, M., Adam, M., et Metters, K. M. (1993). Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J Biol Chem*, **268**, 26767-26772.

Furst, D. E. (1994). Are there differences among nonsteroidal antiinflammatory drugs? *Arthritis Rheum*, **37**, 1-9.

Futaki, N., Yoshikawa, K., Hamasaka, Y., et al, e. (1993). NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. *Gen Pharmacol*, **24**, 105-110.

Gann, P. H., Manson, J. E., Glynn, R. J., Buring, J. E., et Hennekens, C. H. (1993). Low-dose aspirin and incidence of colorectal tumors in a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*, **85**, 1220-1224.

Garavito, R., et DeWitt, D. (1999). The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta*, **1441**, 278-287.

Garcia Rodriguez, L. A., et Huerta-Alvarez, C. (2000). Reduced incidence of colorectal adenoma among long-term users of nonsteroidal antiinflammatory drugs: a pooled analysis of published studies and a new population-based study. *Epidemiology*, **11**, 376-381.

Garcia-Rodriguez, L. A., et Huerta-Alvarez, C. (2001). Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology*, **12**, 88-93.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., et Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**, 493-501.

Giardina, C., et Inan, M. S. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids, and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, **1401**, 277-288.

Giovannucci, E., Egan, K. M., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willett, W. C., et Speizer, F. E. (1995a). Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med*, **333**, 609-614.

Giovannucci, E., Egans, K. M., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willett, W. C., et Speizer, F. E. (1995b). Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med*, **333**, 609-614.

Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A., et Willett, W. C. (1994a). Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med*, **121**, 241-246.

Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A., et Willett, W. C. (1994b). Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med*, **121**, 241-246.

Giovannucci, E., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rimm, E. B., Trichopoulos, D., Rosner, B. A., Speizer, F. E., et Willett, W. C. (1993). Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst*, **85**, 875-884.

Goldberg, Y., Nassif, II, Pittas, A., Tsai, L. L., Dynlacht, B. D., Rigas, B., et Shiff, S. J. (1996). The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins. *Oncogene*, **12**, 893-901.

Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., et Green, D. R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*, **2**, 156-162.

Gomez-Lechon, M. J., Ponsoda, X., O'Connor, E., Donato, T., Castell, J. V., et Jover, R. (2003). Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochem Pharmacol*, **66**, 2155-2167.

Gonzalez, M. V., Jimenez, B., Berciano, M. T., Gonzalez-Sancho, J. M., Caelles, C., Lafarga, M., et Munoz, A. (2000). Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the Activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *J Cell Biol*, **150**, 1199-1208.

Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J., et Shore, G. C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*, **143**, 207-215.

Graham, D. Y., Agrawal, N. M., et Roth, S. H. (1988). Prevention of NSAID-induced gastric ulcer with misoprostol: multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, **2**, 1277-1280.

Granstrom, E., et Samuelsson, B. (1978). Quantitative measurement of prostaglandins and thromboxanes: general considerations. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res*, **5**, 1-13.

Greenberg, E. R., Baron, J. A., Freeman, D. H., Jr., Mandel, J. S., et Haile, R. (1993). Reduced risk of large-bowel adenomas among aspirin users. The Polyp Prevention Study Group. *J Natl Cancer Inst*, **85**, 912-916.

Gridley, G., McLaughlin, J. K., Ekbom, A., Klareskog, L., Adami, H. O., Hacker, D. G., Hoover, R., et Fraumeni, J. F., Jr. (1993). Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis. *J Natl Cancer Inst*, **85**, 307-311.

Grilli, M., Pizzi, M., Memo, M., et Spano, P. (1996). Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science*, **274**, 1383-1385.

Grosch, S., Tegeder, I., Niederberger, E., Brautigam, L., et Geisslinger, G. (2001). COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *Faseb J*, **15**, 2742-2744.

Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., et Korsmeyer, S. J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J*, **17**, 3878-3885.

Gunderson, L. L., et Sosin, H. (1974). Areas of failure found at reoperation (second or symptomatic look) following "curative surgery" for adenocarcinoma of the rectum. Clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy. *Cancer*, **34**, 1278-1292.

Gunter, T. E., et Pfeiffer, D. R. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, **258**, C755-786.

Gwyn, K., et Sinicrope, F. A. (2002). Chemoprevention of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*, **97**, 13-21.

Habeeb, A., Praveen Rao, P., et Knaus, E. (2000). Design and syntheses of diarylisoxazoles: Novel inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) with analgesic-antiinflammatory activity. *Drug Dev Res*, **51**, 273-286.

Hague, A., Manning, A. M., Hanlon, K. A., Huschtscha, L. I., Hart, D., et Paraskeva, C. P. (1993). Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer*, **55**, 498-505.

Hanif, R., Pittas, A., Feng, Y., Koutsos, M., Qiao, L., Staiano-Coico, L., Shiff, S. I., et Rigas, B. (1996). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol*, **52**, 237-245.

Hansen, M. B., Nielsen, S. E., et Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, **119**, 203-210.

Haouzi, D., et Kroemer, G. (2001). Les mitochondries : organisatrices du suicide cellulaire, exécutrices de la cytothanatose. *Médecine/Sciences*, **17**, 225-229.

Harrington, E. A., Fanidi, A., et Evan, G. I. (1994). Oncogenes and cell death. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 120-129.

Hawcroft, G., Gardner, S. H., et Hull, M. A. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not explain the antiproliferative activity of the nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on human colorectal cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **305**, 632-637.

He, T. C., Chan, T. A., Vogelstein, B., et Kinzler, K. W. (1999). PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*, **99**, 335-345.

Hengartner, M. O., et Horvitz, H. R. (1994). Programmed cell death in Caenorhabditis elegans. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 581-586.

Henry, J. C. (1988). Les prostaglandines. *IBS*, **14**, 121-131.

Hermanek, P. (1982). Evolution and pathology of rectal cancer. *World J Surg*, **6**, 502-509.

Herschman, H. R. (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta*, **1299**, 125-140.

Hillon, P., Faivre, J., Milan, C., Bedenne, L., Piard, F., et Klepping, C. (1985). [Cancers of the rectum and colon in the Cote-d'Or department: treatment, prognosis]. *Gastroenterol Clin Biol*, **9**, 704-711.

Hofmann, K., Bucher, P., et Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci*, **22**, 155-156.

Homma, Y., Ozono, S., Numata, I., Seidenfeld, J., et Oyasu, R. (1985). Inhibition of carcinogenesis by alpha-difluoromethylornithine in heterotopically transplanted rat urinary bladders. *Cancer Res*, **45**, 648-652.

Hori, T., Matsumoto, K., Sakaitani, Y., Sato, M., et Morotomi, M. (1998). Effect of dietary deoxycholic acid and cholesterol on fecal steroid concentration and its impact on the colonic crypt cell proliferation in azoxymethane-treated rats. *Cancer Lett*, **124**, 79-84.

Hsu, A. L., Ching, T. T., Wang, D. S., Song, X., Rangnekar, V. M., et Chen, C. S. (2000). The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem*, **275**, 11397-11403.

Hsu, H., Xiong, J., et Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, **81**, 495-504.

Hu, S., et Yang, X. (2000). dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the Drosophila caspase DREDD.PG - 30761-4. *J Biol Chem*, **275**.

Huang, Y. C., Chuang, L. Y., et Hung, W. C. (2002). Mechanisms underlying nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced p27(Kip1) expression. *Mol Pharmacol*, **62**, 1515-1521.

Hueber, A. O., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., et Evan, G. I. (1997). Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science*, **278**, 1305-1309.

Huff, R., Collins, P., Kramer, S., Seibert, K., Koboldt, C., Gregory, S., et Isakson, P. (1995). A structural feature of N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl] methanesulfonamide (NS-398) that governs its selectivity and affinity for cyclooxygenase 2 (COX2). *Inflamm Res*, **44 Suppl 2**, S145-146.

Huls, G., Koornstra, J. J., et Kleibeuker, J. H. (2003). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and molecular carcinogenesis of colorectal carcinomas. *Lancet*, **362**, 230-232.

Ichikawa, A., Sugimoto, Y., et Negishi, M. (1996). Molecular aspects of the structures and functions of the prostaglandin E receptors. *J Lipid Mediat Cell Signal*, **14**, 83-87.

Ikui, A. E., Yao, Y., Zhou, P., et Weinstein, I. B. (2001). Induction of apoptosis by sulindac sulfide in HL60 cells is enhanced by p21CiP1 or p27KiP1. *Anticancer Res*, **21**, 2297-2303.

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

Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., et Yamamoto, T. (2000). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling.PG - 14-24. *Exp Cell Res*, **254**.

Iseki, S. (1995). Immunocytochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the rat stomach. *Histochem J*, **27**, 323-328.

Jacoby, R. F., Cole, C. E., Tutsch, K., Newton, M. A., Kelloff, G., Hawk, E. T., et Lubet, R. A. (2000a). Chemopreventive efficacy of combined piroxicam and difluoromethylornithine treatment of Apc mutant Min mouse adenomas, and selective toxicity against Apc mutant embryos. *Cancer Res*, **60**, 1864-1870.

Jacoby, R. F., Seibert, K., Cole, C. E., Kelloff, G., et Lubet, R. A. (2000b). The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res*, **60**, 5040-5044.

Jaffe, B. M. (1974). Prostaglandins and cancer: an update. *Prostaglandins*, **6**, 453-461.

Jiang, C., Ting, A. T., et Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, **391**, 82-86.

Johansson, C., et Bergstrom, S. (1982). Prostaglandin and protection of the gastroduodenal mucosa. *Scand J Gastroenterol Suppl*, **77**, 21-46.

Jones, D. A., Carlton, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., et Prescott, S. M. (1993). Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, **268**, 9049-9054.

Jouzeau, J. Y., Terlain, B., Abid, A., Nedelec, E., et Netter, P. (1997). Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs*, **53**, 563-582.

Juin, P., Hueber, A. O., Littlewood, T., et Evan, G. (1999). c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev*, **13**, 1367-1381.

Kandasamy, K., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J., Bryant, J. L., et Srivastava, R. K. (2003). Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Res*, **63**, 1712-1721.

Kanno, T., Fujita, H., Muranaka, S., Yano, H., Utsumi, T., Yoshioka, T., Inoue, M., et Utsumi, K. (2002). Mitochondrial swelling and cytochrome c release: sensitivity to cyclosporin A and calcium. *Physiol Chem Phys Med NMR*, **34**, 91-102.

Kasbekar, D. K. (1973). Effects of salicylate and related compounds on gastric HCl secretion. *Am J Physiol*, **225**, 521-527.

Kauppi, M., Pukkala, E., et Isomaki, H. (1996). Low incidence of colorectal cancer in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, **14**, 551-553.

Kelekar, A., et Thompson, C. B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*, **8**, 324-330.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., et Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.

Kharbanda, S., Saxena, S., Yoshida, K., Pandey, P., Kaneki, M., Wang, Q., Cheng, K., Chen, Y. N., Campbell, A., Sudha, T., et coll (2000). Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *J Biol Chem*, **275**, 322-327.

Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., et Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.PG - 5579-88. *Embo J*, **14**.

Kliewer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M., et Lehmann, J. M. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 4318–4323.

Kliewer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., et Evans, R. M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*, **358**, 771-774.

Knezevic, I., Borg, C., et Le Breton, G. C. (1993). Identification of Gq as one of the G-proteins which copurify with human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors. *J Biol Chem*, **268**, 26011-26017.

Koester, S. K., Roth, P., Mikulka, W. R., Schlossman, S. F., Zhang, C., et Bolton, W. E. (1997). Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *Cytometry*, **29**, 306-312.

Koopman, G., Reutelingsperge, C. P. M., Kuitjen, G. A. M., Keehnen, R. M. J., Pals, S. T., et Van Oers, M. H. J. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**, 1415-1420.

Kopp, E., et Ghosh, S. (1994). Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*, **265**, 956-959.

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

Krishan, A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol*, **66**, 188-193.

Kroemer, G., et Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, **6**, 513-519.

Kubota, T., Koshizuka, K., Williamson, E. A., Asou, H., Said, J. W., Holden, S., Miyoshi, I., et Koeffler, H. P. (1998). Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **58**, 3344-3352.

Kudo, I., et Murakami, M. (2002). Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **68-69**, 3-58.

Kujubu, D. A., Fletcher, B. S., Varnum, B. C., Lim, R. W., et Herschman, H. R. (1991). TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, **266**, 12866-12872.

Kulmacz, R. J. (1986). Prostaglandin H synthase and hydroperoxides: peroxidase reaction and inactivation kinetics. *Arch Biochem Biophys*, **249**, 273-285.

Kulmacz, R. J. (1998). Cellular regulation of prostaglandin H synthase catalysis. *FEBS Lett*, **430**, 154-157.

Kulmacz, R. J., Pendleton, R. B., et Lands, W. E. (1994). Interaction between peroxidase and cyclooxygenase activities in prostaglandin-endoperoxide synthase. Interpretation of reaction kinetics. *J Biol Chem*, **269**, 5527-5536.

Kune, G. A., Kune, S., et Watson, L. F. (1988). Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res*, **48**, 4399-4404.

Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., et coll (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, **384**, 644-648.

Kutchera, W., Jones, D. A., Matsunami, N., Groden, J., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., White, R. L., et Prescott, S. M. (1996). Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 4816-4820.

La Vecchia, C., Negri, E., Franceschi, S., Conti, E., Montella, M., Giacosa, A., Falcini, A., et Decarli, A. (1997). Aspirin and colorectal cancer. *Br J Cancer*, **76**, 675-677.

Labaune, J. P. (1988). Pharmacocinétique - Principes fondamentaux, 2ème edn (Paris, Masson).

Lands, W. E., et Samuelsson, B. (1968). Phospholipid precursors of prostaglandins. *Biochim Biophys Acta*, **164**, 426-429.

Langman, M. J., Cheng, K. K., Gilman, E. A., et Lancashire, R. J. (2000). Effect of anti-inflammatory drugs on overall risk of common cancer: case-control study in general practice research database. *Bmj*, **320**, 1642-1646.

Lee, S. H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D., et Hwang, D. (1992). Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, **267**, 25934-25938.

Lehmann, J. M., Lenhard, J. M., Oliver, B. B., Ringold, G. M., et Kliewer, S. A. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 3406–3410.

Levy, G. N. (1997). Prostaglandin H synthase, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J*, **11**, 234-247.

Li, C. S., Black, W. C., Chan, C. C., Ford-Hutchinson, A. W., Gauthier, J. Y., Gordon, R., Guay, D., Kargman, S., Lau, C. K., Mancini, J., et et al. (1995). Cyclooxygenase-2 inhibitors. Synthesis and pharmacological activities of 5-methanesulfonamido-1-indanone derivatives. *J Med Chem*, **38**, 4897-4905.

Li, H., Liu, L., David, M. L., Whitehead, C. M., Chen, M., Fetter, J. R., Sperl, G. J., Pamukcu, R., et Thompson, W. J. (2002). Pro-apoptotic actions of exisulind and CP461 in SW480 colon tumor cells involve beta-catenin and cyclin D1 down-regulation. *Biochem Pharmacol*, **64**, 1325-1336.

Li, H., Schut, H. A., Conran, P., Kramer, P. M., Lubet, R. A., Steele, V. E., Hawk, E. E., Kelloff, G. J., et Pereira, M. A. (1999). Prevention by aspirin and its combination with alpha-difluoromethylornithine of azoxymethane-induced tumors, aberrant crypt foci and prostaglandin E2 levels in rat colon. *Carcinogenesis*, **20**, 425-430.

Li, M., Wu, X., et Xu, X. C. (2001). Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. *Clin Cancer Res*, **7**, 1010-1016.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., et Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.

Lichtenstein, D., Syngal, S., et Wolfe, M. (1995). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract: the double-edged sword. *Arthritis Rheum*, **1**, 5-18.

Lipsky, P., Abramson, S., Crofford, L., et al, e. (1998). The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J Rheumatol*, **25**, 2298-2303.

Little, J., , et . (1994). Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal neoplasia. *International J Oncol*, **5**, 1151-1162.

Logan, R. F., Little, J., Hawtin, P. G., et Hardcastle, J. D. (1993). Effect of aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs on colorectal adenomas: case-control study of subjects participating in the Nottingham faecal occult blood screening programme. *Bmj*, **307**, 285-289.

Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., et Browner, M. F. (1996). Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol*, **3**, 927-933.

Lynch, H. T., et de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, **348**, 919-932.

Lynch, H. T., Thorson, A. G., et Smyrk, T. (1995). Rectal cancer after prolonged sulindac chemoprevention. A case report. *Cancer*, **75**, 936-938.

Lysz, T. W., et Needleman, P. (1982). Evidence for two distinct forms of fatty acid cyclooxygenase in brain. *J Neurochem*, **38**, 1111-1117.

Madara, J. L., Nash, S., Moore, R., et Atisook, K. (1990). Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. *Monogr Pathol*, 306-324.

Mahmoud, N. N., Dannenberg, A. J., Mestre, J., Bilinski, R. T., Churchill, M. R., Martucci, C., Newmark, H., et Bertagnolli, M. M. (1998). Aspirin prevents tumors in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Surgery*, **124**, 225-231.

Mahmud, T. (1995). Uncoupling of oxidative phosphorylation by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is related to ionizable moiety and can be altered by modification of carboxylic group. *Arthritis Rheum*, **38 (suppl)**, 326.

Mahmud, T., Rafi, S. S., Scott, D. L., Wrigglesworth, J. M., et Bjarnason, I. (1996a). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Arthritis Rheum*, **39**, 1998-2003.

Mahmud, T., Scott, D. L., et Bjarnason, I. (1996b). A unifying hypothesis for the mechanism of NSAID related gastrointestinal toxicity. *Ann Rheum Dis*, **55**, 211-213.

Mancini, M., Anderson, B. O., Caldwell, E., Sedghinasab, M., Paty, P. B., et Hockenbery, D. M. (1997). Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line. *The Journal of Cell Biology*, **138**, 449-469.

Marcus, A. J. (1995). Aspirin as prophylaxis against colorectal cancer. *N Engl J Med*, **333**, 656-658.

Marnett, L. J. (1992). Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res*, **52**, 5575-5589.

Martinez, M. E., McPherson, R. S., Levin, B., et Annegers, J. F. (1995). Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal adenomatous polyps among endoscoped individuals. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **4**, 703-707.

Martinou, J. C., Desagher, S., et Antonsson, B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol*, **2**, E41-43.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J. M., Susin, S. A., Vieira, H. L., Prevost, M. C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J. C., et Kroemer, G. (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, **281**, 2027-2031.

Masubuchi, Y., Nakayama, S., et Horie, T. (2002). Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats. *Hepatology*, **35**, 544-551.

Mathias, M. M., et Dupont, J. (1979). The relationship of dietary fats to prostaglandin biosynthesis. *Lipids*, **14**, 247-252.

May, P., et May, E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, **18**, 7621-7636.

Mayeux, P. R., Mais, D. E., Carr, C., et Halushka, P. V. (1989). Human erythroleukemia cells express functional thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **250**, 923-927.

Meade, E. A., Smith, W. L., et DeWitt, D. L. (1993). Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, **268**, 6610-6614.

Merlie, J. P., Fagan, D., Mudd, J., et Needleman, P. (1988). Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem*, **263**, 3550-3553.

Migita, K., Tanaka, H., Okamoto, K., Yoshikawa, N., Ichinose, Y., Urayama, S., Yamasaki, S., Ida, H., Kawabe, Y., Kawakami, A., et Eguchi, K. (2000). FK506 augments glucocorticoid-mediated cyclooxygenase-2 down-regulation in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Lab Invest*, **80**, 135-141.

Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M., et Thompson, C. B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, **385**, 353-357.

Mitchell, K. O., Ricci, M. S., Miyashita, T., Dicker, D. T., Jin, Z., Reed, J. C., et El-Deiry, W. S. (2000). Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res*, **60**, 6318-6325.

Mitrovic, D., Lippiello, L., Gruson, F., Aprile, F., et Mankin, H. J. (1981). Effects of various prostanoids on the in vitro metabolism of bovine articular chondrocytes. *Prostaglandins*, **22**, 499-511.

Miyahara, J. T., et Karler, R. (1965). Effect of salicylate on oxidative phosphorylation and respiration of mitochondrial fragments. *Biochem J*, **97**, 194-198.

Moreno-Sanchez, R., Bravo, C., Vasquez, C., Ayala, G., Silveira, L. H., et Martinez-Lavin, M. (1999). Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. *Biochem Pharmacol*, **57**, 743-752.

Morita, I., Schindler, M., Regier, M. K., Otto, J. C., Hori, T., DeWitt, D. L., et Smith, W. L. (1995). Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem*, **270**, 10902-10908.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.

Muller, A. D., Sonnenberg, A., et Wasserman, I. H. (1994). Diseases preceding colon cancer. A case-control study among veterans. *Dig Dis Sci*, **39**, 2480-2484.

Muscat, J. E., Stellman, S. D., et Wynder, E. L. (1994). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and colorectal cancer. *Cancer*, **74**, 1847-1854.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, **88**, 355-365.

Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A., et Narumiya, S. (1993). Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature*, **365**, 166-170.

Narisawa, T., Fukaura, Y., Terada, K., et Sekiguchi, H. (1999). Inhibitory effects of ursodeoxycholic acid on N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis and colonic mucosal telomerase activity in F344 rats. *J Exp Clin Cancer Res*, **18**, 259-266.

Narisawa, T., Fukaura, Y., Terada, K., Umezawa, A., Tanida, N., Yazawa, K., et Ishikawa, C. (1994). Prevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis by HMG-CoA reductase inhibitors, pravastatin and simvastatin, in ICR mice. *Carcinogenesis*, **15**, 2045-2048.

Narisawa, T., Morotomi, M., Fukaura, Y., Hasebe, M., Ito, M., et Aizawa, R. (1996). Chemoprevention by pravastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor, of N-methyl-N-nitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Jpn J Cancer Res*, **87**, 798-804.

Needleman, P., Raz, A., Minkes, M. S., Ferrendelli, J. A., et Sprecher, H. (1979). Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 944-948.

Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., et Lefkowith, J. B. (1986). Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem*, **55**, 69-102.

Negishi, M., Namba, T., Sugimoto, Y., Irie, A., Katada, T., Narumiya, S., et Ichikawa, A. (1993). Opposite coupling of prostaglandin E receptor EP3C with Gs and G(o). Stimulation of Gs and inhibition of G(o). *J Biol Chem*, **268**, 26067-26070.

Nigro, N. D., Bull, A. W., et Boyd, M. E. (1986). Inhibition of intestinal carcinogenesis in rats: effect of difluoromethylornithine with piroxicam or fish oil. *J Natl Cancer Inst*, **77**, 1309-1313.

Nishigaki, N., Negishi, M., Sugimoto, Y., Namba, T., Narumiya, S., et Ichikawa, A. (1993). Characterization of the prostaglandin E receptor expressed on a cultured mast cell line, BNu-2cl3. *Biochem Pharmacol*, **46**, 863-869.

Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K., et Schultz, G. (1994). G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 504-508.

O'Grady, J., et Moncada, S. (1978). Aspirin: A paradoxical effect on bleeding-time. *Lancet*, **2**, 780.

Okada, H., Suh, W. K., Jin, J., Woo, M., Du, C., Elia, A., Duncan, G. S., Wakeham, A., Itie, A., Lowe, S. W., et coll (2002). Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. *Mol Cell Biol*, **22**, 3509-3517.

O'Keefe, R. J., Crabb, I. D., Puzas, J. E., et Rosier, R. N. (1992). Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res*, **7**, 397-404.

O'Neill, G. P., et Ford-Hutchinson, A. W. (1993). Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett*, **330**, 156-160.

Ormrod, D., Wellington, K., et Wagstaff, A. J. (2002). Valdecoxib. *Drugs*, **62**, 2059-2071; discussion 2072-2053.

Oshima, M., Dinchuk, J. E., Kargman, S. L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J. M., Evans, J. F., et Taketo, M. M. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*, **87**, 803-809.

Oshima, M., Murai, N., Kargman, S., Arguello, M., Luk, P., Kwong, E., Taketo, M. M., et Evans, J. F. (2001). Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res*, **61**, 1733-1740.

Ota, S., Bamba, H., Kato, A., Kawamoto, C., Yoshida, Y., et Fujiwara, K. (2002). Review article: COX-2, prostanoids and colon cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, **16 Suppl 2**, 102-106.

Otto, J. C., et Smith, W. L. (1994). The orientation of prostaglandin endoperoxide synthase 1 and 2 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **269**, 19868-19875.

Otto, J. C., et Smith, W. L. (1995). Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal*, **12**, 139-156.

Paganini-Hill, A., Chao, A., Ross, R. K., et Henderson, B. E. (1989). Aspirin use and chronic diseases: a cohort study of the elderly. *Bmj*, **299**, 1247-1250.

Pairet, M. (1998). Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. Analysis of the in vitro test systems and their clinical relevance. *J Clin Rheumatol*, **4**, S17-25.

Pairet, M., Netter, P., Jouzeau, J., et al., e. (1999). Inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2) : intérêts et limites. *Thérapie*, **54**, 433-445.

Panara, M., Padovano, R., Sciulli, M., et al, e. (1998). Effects of nimesulide on constitutive and inducible prostanoid biosynthesis in man. *Clin Pharmacol Ther*, **63**, 672-681.

Park, J. G., Kramer, B. S., Steinberg, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D., et Gazard, A. F. (1987). Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res*, **47**, 5875-5879.

Parkin, D. M., et Muir, C. S. (1992). Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ*, 45-173.

Pasricha, P. J., Bedi, A., O'Connor, K., Rashid, A., Akhtar, A. J., Zahurak, M. L., Piantadosi, S., Hamilton, S. R., et Giardiello, F. M. (1995). The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in Familial Adenomatous Polyposis. *Gastroenterology*, **109**, 994-998.

Patel, R., Attur, M. G., Dave, M., Abramson, S. B., et Amin, A. R. (1999). Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E2 production by nitric oxide in activated murine macrophages. *J Immunol*, **162**, 4191-4197.

Patrignani, P., Panara, M. R., Greco, A., Fusco, O., Natoli, C., Iacobelli, S., Cipollone, F., Ganci, A., Creminon, C., Maclouf, J., et et al. (1994). Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther*, **271**, 1705-1712.

Peleg, II, Lubin, M. F., Cotsonis, G. A., Clark, W. S., et Wilcox, C. M. (1996). Long-term use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and other chemopreventors and risk of subsequent colorectal neoplasia. *Dig Dis Sci*, **41**, 1319-1326.

Penning, T., Talley, J., Bertenshaw, S., et al, e. (1997). 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*, **40**, 1347-1365.

Percival, M. D., Ouellet, M., Vincent, C. J., Yergey, J. A., Kennedy, B. P., et O'Neill, G. P. (1994). Purification and characterization of recombinant human cyclooxygenase-2. *Arch Biochem Biophys*, **315**, 111-118.

Piazza, G. A., Rahm, A. K., Finn, T. S., Fryer, B. H., Li, H., Stoumen, A. L., Pamukcu, R., et Ahnen, D. J. (1997). 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*, **57**, 2452-2459.

Piazza, G. A., Rahm, A. L., Krutzsch, M., Sperl, G., Paranka, N. S., Gross, P. H., Brendel, K., Burt, R. W., Alberts, D. S., Pamukcu, R., et et al. (1995). Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res*, **55**, 3110-3116.

Picot, D., Loll, P. J., et Garavito, R. M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, **367**, 243-249.

Pinczowski, D., Ekbom, A., Baron, J., Yuen, J., et Adami, H. O. (1994). Risk factors for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology*, **107**, 117-120.

Pinto, D. J., Batt, D. G., Pitts, W. J., Petraitis, J. J., Orwat, M. J., Wang, S., Jetter, J. W., Sherk, S. R., Houghton, G. C., Copeland, R. A., et coll (1999). Terphenyl cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: optimization of the central ring and o-biphenyl analogs. *Bioorg Med Chem Lett*, **9**, 919-924.

Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simmon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., et Zweibaum, A. (1983). Enterocyte like differentiation polarization of the human colon carcinoma cell line Caco2 in culture. *Biol Cell*, **47**, 323-330.

Polakis, P., Hart, M., et Rubinfeld, B. (1999). Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol*, **470**, 23-32.

Porter, S. N., Howarth, G. S., et Butler, R. N. (2000). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and apoptosis in the gastrointestinal tract: potential role of the pentose phosphate pathways. *Eur J Pharmacol*, **397**, 1-9.

Potter, J. D. (1999). Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 916-932.

Preston, G. A., Lyon, T. T., Yin, Y., Lang, J. E., Solomon, G., Annab, L., Srinivasan, D. G., Alcorta, D. A., et Barrett, J. C. (1996). Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Mol Cell Biol*, **16**, 211-218.

Pugh, S., et Thomas, G. A. (1994). Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut*, **35**, 675-678.

Qiao, L., Kozoni, V., Tsioulias, G. J., Koutsos, M. I., Hanif, R., Shiff, S. J., et Rigas, B. (1995). Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo. *Biochim Biophys Acta*, **1258**, 215-223.

Qiao, L., Shiff, S. J., et Rigas, B. (1998). Sulindac sulfide alters the expression of cyclin proteins in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*, **76**, 99-104.

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

Reddy, B. S., Nayini, J., Tokumo, K., Rigotty, J., Zang, E., et Kelloff, G. (1990). Chemoprevention of colon carcinogenesis by concurrent administration of piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug with D,L-alpha-difluoromethylornithine, an ornithine decarboxylase inhibitor, in diet. *Cancer Res*, **50**, 2562-2568.

Reddy, B. S., Rao, C. V., Rivenson, A., et Kelloff, G. (1993). Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis*, **14**, 1493-1497.

Reeves, M. J., Newcomb, P. A., Trentham-Dietz, A., Storer, B. E., et Remington, P. L. (1996). Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and protection against colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **5**, 955-960.

Reimer, R., Heim, H. K., Muallem, R., Odes, H. S., et Sewing, K. F. (1992). Effects of EP-receptor subtype specific agonists and other prostanoids on adenylate cyclase activity of duodenal epithelial cells. *Prostaglandins*, **44**, 485-493.

Ricci, J.-E. (2000) Rôle de la tyrosine kinase p59fyn et des protéines du choc thermique dans l'apoptose induite par l'engagement des récepteurs de mort et du récepteur T, Thèse de doctorat, Université de Nice - Sophia antipolis.

Rice, P. L., Kelloff, J., Sullivan, H., Driggers, L. J., Beard, K. S., Kuwada, S., Piazza, G., et Ahnen, D. J. (2003). Sulindac metabolites induce caspase- and proteasome-dependent degradation of beta-catenin protein in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther*, **2**, 885-892.

Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J., et Glass, C. K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, **391**, 79-82.

Rosenberg, L., Louik, C., et Shapiro, S. (1998). Nonsteroidal antiinflammatory drug use and reduced risk of large bowel carcinoma. *Cancer*, **82**, 2326-2333.

Rosenberg, L., Palmer, J. R., Zauber, A. G., Warshauer, M. E., Stolley, P. D., et Shapiro, S. (1991). A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst*, **83**, 355-358.

Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., et coll (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*, **3**, 619-625.

Ruffin, M. T. t., Krishnan, K., Rock, C. L., Normolle, D., Vaerten, M. A., Peters-Golden, M., Crowell, J., Kelloff, G., Boland, C. R., et Brenner, D. E. (1997). Suppression of human colorectal mucosal prostaglandins: determining the lowest effective aspirin dose. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 1152-1160.

Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., et Cossarizza, A. (1997). JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett*, **411**, 77-82.

Samuelsson, B. (1983). Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, **220**, 568-575.

Sandler, R. S., Galanko, J. C., Murray, S. C., Helm, J. F., et Woosley, J. T. (1998). Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory agents and risk for colorectal adenomas. *Gastroenterology*, **114**, 441-447.

Sandler, R. S., Halabi, S., Baron, J. A., Budinger, S., Paskett, E., Keresztes, R., Petrelli, N., Pipas, J. M., Karp, D. D., Loprinzi, C. L., et coll (2003). A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med*, **348**, 883-890.

Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G., et Korsmeyer, S. J. (1997). Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11357-11362.

Schoen, R. T., et Vender, R. J. (1989). Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. *Am J Med*, **86**, 449-458.

Schreinemachers, D. M., et Everson, R. B. (1994). Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology*, **5**, 138-146.

Schwaner, I., Offermanns, S., Spicher, K., Seifert, R., et Schultz, G. (1995). 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*, **1265**, 8-14.

Seed, B. (1998). PPARgamma and colorectal carcinoma: conflicts in a nuclear family. *Nat Med*, **4**, 1004-1005.

Ségal-Bendirdjian, E. (1999). Mort cellulaire : signalisation et exécution de l'apoptose. *Hématologie*, **5**, 376-387.

Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., et Isakson, P. (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12013-12017.

Shen, T. Y., et Winter, C. A. (1977). Chemical and biological studies on indomethacin, sulindac and their analogs. *Adv Drug Res*, **12**, 90-245.

Sheng, H., Shao, J., Kirkland, S. C., Isakson, P., Coffey, R. J., Morrow, J., Beauchamp, R. D., et DuBois, R. N. (1997). Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest*, **99**, 2254-2259.

Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, **9**, 459-470.

Shiff, S. J., Koutsos, M. I., Qiao, L., et Rigas, B. (1996). Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Experimental Cell Research*, **222**, 179-188.

Shiff, S. J., Qiao, L., Tsai, L. L., et Rigas, B. (1995). Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest*, **96**, 491-503.

Shimizu, S., Narita, M., et Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-487.

Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., et Lenardo, M. J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, **288**, 2354-2357.

Simon, L., Lanza, F., Lipsky, P., et al, e. (1998). Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor. *Arthritis Rheum*, **41**, 1591-1602.

Smaili, S. S., Hsu, Y. T., Sanders, K. M., Russell, J. T., et Youle, R. J. (2001). Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death Differ*, **8**, 909-920.

Smalley, W., Ray, W. A., Daugherty, J., et Griffin, M. R. (1999). Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: a population-based study. *Arch Intern Med*, **159**, 161-166.

Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., Jr., et Chen, L. B. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3671-3675.

Smith, M. L., Hawcroft, G., et Hull, M. A. (2000a). The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. *Eur J Cancer*, **36**, 664-674.

Smith, W., DeWitt, D., et Garavito, R. (2000b). Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, **69**, 145-182.

Smith, W. L. (1986). Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu Rev Physiol*, **48**, 251-262.

Smith, W. L., DeWitt, D. L., Kraemer, S. A., Andrews, M. J., Hla, T., Maciag, T., et Shimokawa, T. (1990). Structure-function relationships in sheep, mouse, and human prostaglandin endoperoxide G/H synthases. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, **20**, 14-21.

Smith, W. L., Garavito, R. M., et DeWitt, D. L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, **271**, 33157-33160.

Smith, W. L., et Marnett, L. J. (1991). Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta*, **1083**, 1-17.

Somasundaram, S., Hayllar, J., Rafi, S., Wrigglesworth, J. M., MacPherson, A. J. S., et Bjarnason, I. (1995). The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastro-intestinal tract: a review and a hypothesis. *Scand J Gastroenterol*, **30**, 289-299.

Somasundaram, S., Macpherson, A. J., Hayllar, J., Sarathchandra, P., et Bjarnason, I. (1992). Enterocyte mitochondrial damage due to NSAID in the rat. *Gut*, **33 (suppl)**, S5.

Somasundaram, S., Sigthorsson, G., Simpson, R. J., Watts, J., Jacob, M., Tavares, I. A., Rafi, S., Roseth, A., Foster, R., Price, A. B., et coll (2000). Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID-enteropathy in the rat. *Aliment Pharmacol Ther*, **14**, 639-650.

Spagnesi, M. T., Tonelli, F., Dolara, P., Caderni, G., Valanzano, R., Anastasi, A., et Bianchini, F. (1994). Rectal Proliferation and Polyp Occurrence in Patients With Familial Adenomatous Polyposis After Sulindac Treatment. *Gastroenterology*, **106**, 362-366.

Spannhake, E. W., Hyman, A. L., et Kadowitz, P. J. (1981). Bronchoactive metabolites of arachidonic acid and their role in airway function. *Prostaglandins*, **22**, 1013-1026.

Spector, A. A., Gordon, J. A., et Moore, S. A. (1988). Hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs). *Prog Lipid Res*, **27**, 271-323.

Spencer, A. G., Woods, J. W., Arakawa, T., Singer, II, et Smith, W. L. (1998). Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem*, **273**, 9886-9893.

Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., et Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, **1**, 949-957.

Steglich, C., et Scheffler, I. E. (1982). An ornithine decarboxylase-deficient mutant of Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, **257**, 4603-4609.

Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., et coll (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*, **342**, 1946-1952.

Steinberg, J. J., et Sledge, C. B. (1991). Chondrocyte mediated cartilage degradation: regulation by prostaglandin E2, cyclic AMP and interferon alpha. *J Rheumatol Suppl*, **27**, 63-65.

Stichtenoth, D. O., et Frolich, J. C. (2003). The second generation of COX-2 inhibitors: what advantages do the newest offer? *Drugs*, **63**, 33-45.

Stoetzer, O. J., Pogrebniak, A., Pelka-Fleischer, R., Hasmann, M., Hiddemann, W., et Nuessler, V. (2002). Modulation of apoptosis by mitochondrial uncouplers: apoptosis-delaying features despite intrinsic cytotoxicity. *Biochem Pharmacol*, **63**, 471-483.

Strong, H. A., Warner, N. J., Renwick, A. G., et George, C. F. (1985). Sulindac metabolism: the importance of an intact colon. *Clin Pharmacol Ther*, **38**, 387-393.

Stryker, S. J., Wolff, B. G., Culp, C. E., Libbe, S. D., Ilstrup, D. M., et MacCarty, R. L. (1987). Natural history of untreated colonic polyps. *Gastroenterology*, **93**, 1009-1013.

Su, L. K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Preisinger, A. C., Moser, A. R., Luongo, C., Gould, K. A., et Dove, W. F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science*, **256**, 668-670.

Subbegowda, R., et Frommel, T. O. (1998). Aspirin toxicity for human colonic tumor cells results from necrosis and is accompanied by cell cycle arrest. *Cancer Research*, **58**, 2772-2776.

Suh, O., Mettlin, C., et Petrelli, N. J. (1993). Aspirin use, cancer, and polyps of the large bowel. *Cancer*, **72**, 1171-1177.

Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., et coll (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, **192**, 571-580.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et coll (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-446.

Talley, J. J. (1999). Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Prog Med Chem*, **36**, 201-234.

Tanabe, T., et Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 95-114.

Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., et Nakanishi, S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*, **8**, 169-179.

Tatebe, S., Sinicrope, F. A., et Kuo, M. T. (2002). Induction of multidrug resistance proteins MRP1 and MRP3 and gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **290**, 1427-1433.

Tatsumi, K., Kitamura, S., et Yamada, H. (1983). Sulfoxide reductase activity of liver aldehyde oxidase. *Biochim Biophys Acta*, **747**, 86-92.

Tay, A., Squire, J. A., Goldberg, H., et Skorecki, K. (1994). Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **23**, 718-719.

Terlain, B., Jouzeau, J. Y., Abid, A., Nedelec, E., et Netter, P. (1996). Izoenzymes de la cyclooxygenase et anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Lettre du Pharmacologue*, **10**, 136-143.

Tetsu, O., et McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, **398**, 422-426.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.

Thompson, H. J., et Ronan, A. M. (1986). Effect of D,L-2-difluoromethylornithine and endocrine manipulation on the induction of mammary carcinogenesis by 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis*, **7**, 2003-2006.

Thun, M. J., Henley, S. J., et Patrono, C. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst*, **94**, 252-266.

Thun, M. J., Namboodiri, M. M., et Heath, C. W. (1991a). Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med*, **325**, 1593-1596.

Thun, M. J., Namboodiri, M. M., et Heath, C. W., Jr. (1991b). Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med*, **325**, 1593-1596.

Tillman, D. M., Izeradjene, K., Szucs, K. S., Douglas, L., et Houghton, J. A. (2003). Rottlerin sensitizes colon carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis via uncoupling of the mitochondria independent of protein kinase C. *Cancer Res*, **63**, 5118-5125.

Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I., et Spiegelman, B. M. (1994). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, **8**, 1224-1234.

Topol, E. J. (2004). Failing the Public Health -- Rofecoxib, Merck, and the FDA. *N Engl J Med.*

Tsuji, M., et DuBois, R. N. (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, **83**, 493-501.

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

Turnbull, R. B., Jr., Kyle, K., Watson, F. R., et Spratt, J. (1967). Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg*, **166**, 420-427.

Ushikubi, F., Hirata, M., et Narumiya, S. (1995). Molecular biology of prostanoid receptors; an overview. *J Lipid Mediat Cell Signal*, **12**, 343-359.

Ushikubi, F., Nakamura, K., et Narumiya, S. (1994). Functional reconstitution of platelet thromboxane A2 receptors with Gq and Gi2 in phospholipid vesicles. *Mol Pharmacol*, **46**, 808-816.

Vamecq, J., et Latruffe, N. (1999). Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet*, **354**, 141-148.

van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., et coll (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, **111**, 241-250.

Vane, J. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. *Nature*, **231**, 232-235.

Vane, J. (1972). Prostaglandins and the aspirin-like drugs. *Hosp Pract*, 61-71.

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., et Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102**, 43-53.

Versteeg, H. H., van Bergen en Henegouwen, P. M., van Deventer, S. J., et Peppelenbosch, M. P. (1999). Cyclooxygenase-dependent signalling: molecular events and consequences. *FEBS Lett*, **445**, 1-5.

Vinceti, M., Rovesti, S., Bergomi, M., et Vivoli, G. (2000). The epidemiology of selenium and human cancer. *Tumori*, **86**, 105-118.

Von Euler, U. S. (1936). On the specific vasodilatating and pain muscle stimulating substance from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol (Lond)*, **88**, 213-234.

Waddell, W. R., Ganser, G. F., Cerise, E. J., et Loughry, R. W. (1989). Sulindac for polyposis of the colon. *Am J Surg*, **157**, 175-179.

Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D., et coll (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)2 homodimer. *Cell*, **78**, 343-352.

Wang, L. H., Hajibeigi, A., Xu, X. M., Loose-Mitchell, D., et Wu, K. K. (1993). Characterization of the promoter of human prostaglandin H synthase-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **190**, 406-411.

Warner, T. D., et Mitchell, J. A. (2002). Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13371-13373.

Washo-Stultz, D., Crowley-Weber, C. L., Dvorakova, K., Bernstein, C., Bernstein, H., Kunke, K., Waltmire, C. N., Garewal, H., et Payne, C. M. (2002). Role of mitochondrial complexes I and II, reactive oxygen species and arachidonic acid metabolism in deoxycholate-induced apoptosis. *Cancer Lett*, **177**, 129-144.

Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S., et Ichikawa, A. (1993). Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem*, **268**, 20175-20178.

Watanabe, T., Nakao, A., Emerling, D., Hashimoto, Y., Tsukamoto, K., Horie, Y., Kinoshita, M., et Kurokawa, K. (1994). 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*, **269**, 17619-17625.

Weeks, C. E., Herrmann, A. L., Nelson, F. R., et Slaga, T. J. (1982). alpha-Difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits tumor promoter-induced polyamine accumulation and carcinogenesis in mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 6028-6032.

Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., et Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, **14**, 2060-2071.

White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev*, **10**, 1-15.

Wight, N. J., Gottesdiener, K., Garlick, N. M., Atherton, C. T., Novak, S., Gertz, B. J., Calder, N. A., Cote, J., Wong, P., Dallob, A., et Hawkey, C. J. (2001). Rofecoxib, a COX-2 inhibitor, does not inhibit human gastric mucosal prostaglandin production. *Gastroenterology*, **120**, 867-873.

Willoughby, D. A., Moore, A. R., et Colville-Nash, P. R. (2000). COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet*, **355**, 646-648.

Wilson, D. E., et Kaymakcalan, H. (1981). Prostaglandins: gastrointestinal effects and peptic ulcer disease. *Med Clin North Am*, **65**, 773-787.

Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., et coll (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, **370**, 270-275.

Wolfe, M., Lichtenstein, D., et Singh, G. (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med*, **340**, 1888-1899.

Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L., et Simmons, D. L. (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2692-2696.

Xie, W. L., Robertson, D. L., et Simmons, D. L. (1992). Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a novel target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Dev Res*, 249-265.

Xu, X. M., Tang, J. L., Chen, X., Wang, L. H., et Wu, K. K. (1997). Involvement of two Sp1 elements in basal endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity. *J Biol Chem*, **272**, 6943-6950.

Xue, D., et Horvitz, H. R. (1995). Inhibition of the Caenorhabditis elegans cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature*, **377**, 248-251.

Yaksh, T. L. (1999). Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 329-337.

Yamada, H., Kikuchi, T., Nemoto, O., Obata, K., Sato, H., Seiki, M., et Shinmei, M. (1996). Effects of indomethacin on the production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human articular chondrocytes. *J Rheumatol*, **23**, 1739-1743.

Yamagata, K., Andreasson, K. I., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., et Worley, P. F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, **11**, 371-386.

Yamamoto, Y., Yin, M. J., Lin, K. M., et Gaynor, R. B. (1999). Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem*, **274**, 27307-27314.

Yamazaki, R., Kusunoki, N., Matsuzaki, T., Hashimoto, S., et Kawai, S. (2002). Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett*, **531**, 278-284.

Yang, E., et Korsmeyer, S. J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, **88**, 386-401.

Yang, W., Velcich, A., Mariadason, J., Nicholas, C., Corner, G., Houston, M., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Holt, P. R., et Augenlicht, L. H. (2001). p21(WAF1/cip1) is an important determinant of intestinal cell response to sulindac in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **61**, 6297-6302.

Yin, M. J., Yamamoto, Y., et Gaynor, R. B. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature*, **396**, 77-80.

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

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

Zhang, L., Yu, J., Park, B. H., Kinzler, K. W., et Vogelstein, B. (2000). Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*, **290**, 989-992.

Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M., et Salvesen, G. S. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem*, **272**, 7797-7800.

Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., et Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*, **12**, 2424-2433.

Zornig, M., Hueber, A., Baum, W., et Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1551**, F1-37.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., et Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-413.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., et Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, **274**, 11549-11556.

Zweibaum, A. (1993). [Differentiation of human colon cancer cells: a new approach to cancer of the colon]. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)*, **29**, 257-261; discussion 261-252.

ANNEXES

Thérapie 1999; 54: 433-445

Inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2 (cox-2) : intérêts et limites

M. Pairet[*], P. Netter[**] et les participants de la table ronde N° 2 de Giens XIV[†]

[*]Boehinger Ingelheim Pharma KG, Dept of Pulmonary Research, Binger Strasse 173, D-5521 Ingelheim am Rhein, Germany ; [**]Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, B.P. 184,54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

Tirés-à-part : M. Pairet
Texte reçu le 23 mars 1999 et accepté le 13 avril 1999

Résumé : L'existence de deux iso-enzymes de cyclooxygénase, une forme constitutionnelle COX-1, et une forme inductible COX-2, éclaire d'un jour nouveau la relation entre effets thérapeutiques et effets indésirables des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS). Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 semblent tenir leur promesse d'une meilleure tolérance digestive pour une activité anti-inflammatoire comparable à celle des AINS classiques. Leurs effets chez des patients souffrant d'ulcère évolutif ou ayant des antécédents récents d'ulcère ainsi que chez des patients présentant des pathologies rénale ou cardiovasculaire concomitantes doivent encore être évalués de façon approfondie. Leur intérêt thérapeutique dans l'accouchement prématuré, le cancer rectocolique et la maladie d'Alzheimer est en cours d'évaluation clinique.

Mots-clés : cyclooxygénase (COX), COX-1, COX-2, anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), effets indésirables, nouvelles indications potentielles.

Selective COX-2 inhibitors: potentials and limits

Summary: The discovery of an inducible form of cyclooxygenase (COX-2) requires a refinement of the theory that inhibition of cyclooxygenase activity explains both therapeutic effects and side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Selective COX-2 inhibitors have demonstrated in clinical trials a significantly better gastrointestinal tolerability than classical NSAIDs, for the same anti-inflammatory activity. Their tolerability in patients with active ulcer or with a recent history of ulcer as well as in patients suffering from cardiovascular or renal diseases has still to be investigated in detail. Their therapeutic potential in several new indications, including pre-term labour, colorectal cancer and Alzheimer's disease, is currently being investigated.

Key words: cycloxoygenase (COX), COX-1, COX-2, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), side-effects, possible new indications.

Introduction

L'aspirine, découverte il y a 100 ans, a donné naissance à une des classes thérapeutiques les plus prescrites, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique. Trente millions de personnes à travers le monde consomment chaque jour un de ces médicaments. L'utilisation des AINS est malheureusement grevée d'effets indésirables, principalement digestifs (ulcères, perforations, hémorragies) et rénaux (insuffisance rénale aiguë), plus rarement cutanés (syndrome de Lyell), respiratoires (asthme, syndrome de Fernand-Widal), hépatiques, neurologiques, ou cardiovasculaires[1]. Bien qu'en terme de fréquence les effets indésirables sévères soient rares, le volume de prescription en fait un véritable problème de santé publique. Des études épidémiologiques évaluent le risque lié à l'utilisation des AINS à 260 000 hospitalisations et 26 000 décès par an dans le monde[2,3]. La majorité des décès est la conséquence d'hémorragies digestives. Tous les AINS sur le marché sont concernés. Même si des études cas témoin font apparaître un moindre risque pour certains produits[4-6], leur interprétation est rendue délicate par le fait qu'elles ne tiennent qu'imparfaitement compte de la posologie administrée, ou de l'utilisation concomitante d'autres médicaments, y compris des AINS, délivrés sans ordonnance. En fait, sur la base de données épidémiologiques, aucun des produits sur le marché ne présente un rapport bénéfice/risque nettement supérieur à celui des autres membres de sa classe thérapeutique.

[†]J.-Y. Jouzeau, G. Bouvenot, A. Berdeaux, P. Bertin, J. Bonnet, M. Bourin, F. Caussade, G. Charpigny, F.Chazelle, M. Daouphars, N. David, M.-D. Drici, R. Dropsy, V. Guérin, J.-M. Joubert, C. Larousse, F. Néant, D. Picot, D. Riendeau, J. Sassard, B. Terlain.

Jusqu'à récemment, cette conclusion était confortée par nos connaissances sur le mécanisme d'action des AINS, qui ne permettaient pas de dissocier les effets anti-inflammatoires des effets indésirables digestifs et rénaux. Les travaux de Vane en 1971 démontraient clairement que les AINS ont en commun d'inhiber la production de prostaglandines (PGs) en bloquant la cyclooxygénase[7]. Les PGs sont non seulement des médiateurs importants de l'inflammation mais ont aussi diverses fonctions physiologiques : protection de la muqueuse digestive, maintien du débit sanguin rénal, régulation de l'hémostase, pour ne citer que les plus importantes. L'inhibition de la synthèse des PGs par les AINS permettant d'expliquer à la fois leurs effets thérapeutiques et la majorité de leurs effets indésirables, il était difficile d'imaginer comment, à activité thérapeutique comparable, certains produits pourraient être mieux tolérés que d'autres.

La découverte de deux iso-enzymes de cyclooxygénase[8], une forme constitutionnelle (COX-1) et une forme inductible (COX-2), éclaire d'un jour nouveau la relation entre activité thérapeutique et effets indésirables des AINS. En effet, une inhibition sélective de la forme inductible (COX-2) devrait théoriquement conférer une activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables liés à l'inhibition de la forme constitutionnelle (COX-1)[9-11]. L'objectif de notre table ronde était d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une inhibition sélective de COX-2, à partir des données biochimiques, pharmacologiques et cliniques disponibles.

Les cyclooxygénases

COX-1 et COX-2 ont été clonées et leurs structures tridimensionnelles déterminées[12-14]. Ce sont des glycoprotéines membranaires très proches par leur structure et leur activité catalytique : elles présentent une identité de séquence en acides aminés de 67 pour cent ; leurs sites catalytiques ne diffèrent que par un acide aminé, une isoleucine dans COX-1 est remplacée par une valine dans COX-2 ; elles produisent les mêmes précurseurs de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. En fait, les deux iso-enzymes se distinguent surtout par leur profil d'expression tissulaire et leur régulation[15,16]. COX-1 est une enzyme constitutionnelle présente dans la plupart des tissus, en particulier dans la muqueuse digestive, le rein, les plaquettes sanguines (expression exclusive), le cerveau, le foie et la rate. Elle est responsable de la synthèse de prostaglandines qui ont un rôle 'physiologique'. COX-2 est une enzyme essentiellement inductible. A l'exception de certains organes comme le cerveau, la prostate et le rein, où COX-2 est présente de façon constitutionnelle, cette iso-enzyme est peu exprimée dans les conditions basales. Son expression est par contre fortement induite par un stimulus inflammatoire (lipopolysaccharide (LPS) ou cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et TNFα)) dans diverses cellules comme les monocytes-macrophages, les cellules endothéliales, et les synoviocytes. Son expression est en revanche inhibée par les cytokines anti-inflammatoires, comme les interleukines -4, -10 et -13 ainsi que par les glucocorticoïdes[17]. *In vivo*, COX-2 est présente à concentrations élevées dans les sites inflammatoires, que ce soit dans des modèles animaux ou dans les tissus synoviaux de patients arthritiques[18-20]. Toutes ces données soulignent le rôle de la COX-2 dans le processus inflammatoire (Fig. 1). Il serait toutefois incomplet de limiter le rôle de cette iso-enzyme à la pathologie inflammatoire. COX-2 pourrait également être impliquée dans d'autres pathologies, comme le cancer du côlon[21], l'accouchement prématuré[22,23], ou la maladie d'Alzheimer[24,25]. Par ailleurs, dans certains organes, comme le cerveau et le rein, COX-2 est exprimée de façon constitutionnelle et pourrait donc avoir un rôle physiologique[26-28].

Inhibiteurs sélectifs de COX-2

Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 ont été identifiés en s'appuyant sur des tests *in vitro*. Le rapport des CI_{50} (concentration inhibant l'activité enzymatique de 50 pour cent) est utilisé comme indice de sélectivité, un rapport COX-1/COX-2 élevé reflétant une grande sélectivité pour la COX-2. Malheureusement, la valeur de ce rapport varie selon le modèle *in vitro* utilisé et les conditions expérimentales choisies[15,29-33]. Les dosages à partir de sang total humain, basés sur la production de thromboxane B_2 (TXB_2) durant la coagulation (COX-1 plaquettaire) et sur la synthèse de PGE_2 induite par le LPS (COX-2 monocytaire), présentent plusieurs avantages par rapport aux autres systèmes *in vitro*[34,35]: (1) la sélectivité est évaluée dans un milieu physiologique, (2) la facilité d'utilisation permet leur réalisation dans tout laboratoire, (3) les CI_{50} obtenues reflètent à la fois l'activité propre des molécules et leur fixation aux protéines plasmatiques et peuvent donc être comparées aux concentrations thérapeutiques, (4) les valeurs d'indice de sélectivité, plus homogènes et inférieures à celles obtenues dans d'autres systèmes *in vitro*, paraissent plus réalistes. Les indices de sélectivité obtenus avec les différents produits étudiés dans le système du sang total *in vitro*, s'étagent de 0.05, pour certains AINS classiques, à 50, pour certains inhibiteurs sélectifs de COX-2 en cours de développement, avec différentes valeurs intermédiaires. Il est difficile, sur la base des seules données *in vitro*, de définir des valeurs-seuil et de proposer une classification des AINS en fonction de leur sélectivité vis-à-vis des cyclooxygénases. De plus, une sélectivité *in vitro* ne se traduit pas forcément *in vivo*, puisque les concentrations plasmatiques efficaces peuvent excéder les concentrations inhibitrices 50 pour cent obtenues *in vitro* pour les deux iso-enzymes (Fig. 2).

La sélectivité *in vivo* des molécules peut être étudiée en réalisant le test sur sang total *ex vivo*. Dans ces conditions, la molécule à étudier n'est plus ajoutée dans un tube à essai, mais administrée à posologies thérapeutiques à des volontaires sains ou à des patients avant le prélèvement sanguin. Il a pu ainsi être démontré que les AINS classiques, aux différentes posologies utilisées, inhibent significativement l'activité de COX-1. Certains produits actuellement sur le marché, comme le méloxicam et le nimésulide, affectent peu, aux posologies recommandées les plus faibles, l'activité de COX-1[36,37]. Cependant, aux posologies maximales prescrites, une inhibition notable de COX-1 est observée[29,38,39]. Ces produits sont parfois qualifiés 'd'inhibiteurs préférentiels'. Deux produits en phase d'enregistrement, le celecoxib (SC-58635) et le rofécoxib (MK-0966) n'affectent que peu ou pas la production de TXB_2 sérique, et ne modifient ni l'agrégation plaquettaire ni le temps de saignement aux posologies maximales préconisées[40–45]. Cette nouvelle génération d'inhibiteurs devrait permettre de définir les avantages thérapeutiques à long terme d'une inhibition sélective de COX-2.

Le mécanisme moléculaire d'une inhibition sélective de COX-2 s'explique par la différence d'encombrement stérique due à un méthylène supplémentaire en position 523 dans COX-1 (isoleucine) par rapport à COX-2 (valine) au site actif de l'enzyme. Ce site actif est constitué d'un étroit canal essentiellement hydrophobe dans lequel une molécule d'acide arachidonique doit pénétrer pour être transformée en endoperoxyde cyclique. Le méthylène supplémentaire dans COX-1 restreint l'accès d'une poche latérale dans ce canal. Des expériences de mutagénèse dirigée ont testé avec succès cette hypothèse en créant des enzymes avec sélectivité croisée[46,47]. De nombreux inhibiteurs sélectifs de COX-2 exploitent ce principe[48,49]. Certains inhibiteurs utilisent

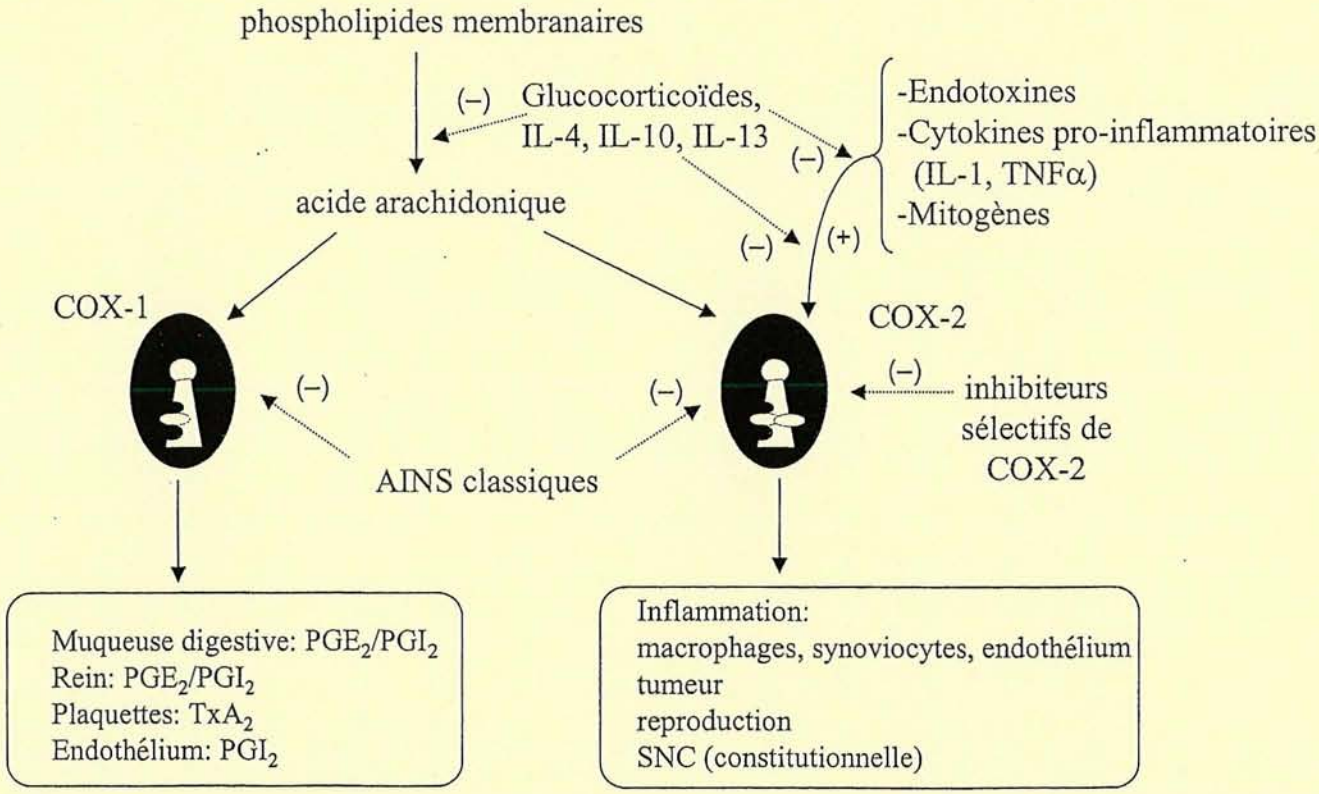


Fig. 1. Représentation schématique du rôle des cyclooxygénases. *Les deux iso-enzymes, COX-1 et COX-2, sont capables de transformer l'acide arachidonique en prostaglandines (PGs). COX-1 est exprimée de façon constitutionnelle dans la plupart des tissus. A ce titre, elle est responsable de la synthèse de PGs exerçant des fonctions physiologiques : protection de la muqueuse digestive, maintien du débit sanguin rénal, régulation de l'hémostase. COX-2 est une enzyme inductible. Son expression est induite par la plupart des stimuli inflammatoires (endotoxine : LPS, cytokines : IL-1 et TNFα), par des substances à activité mitogène et au cours du cycle sexuel. L'expression de COX-2 est constitutionnelle dans certains tissus comme le Système Nerveux Central (SNC). Les glucocorticoïdes, mais aussi certaines cytokines 'anti-inflammatoires' comme les interleukines-4, -10, ou 13, s'opposent à l'induction de COX-2. Les AINS classiques inhibent, à doses thérapeutiques, les deux iso-enzymes. Cela explique que leur activité anti-inflammatoire s'accompagne d'effets indésirables digestifs et rénaux. Certains produits exploitent la différence d'un acide aminé entre COX-1 et COX-2 et bloquent le site actif de COX-2 en pénétrant dans une poche latérale, non accessible dans COX-1. Ces inhibiteurs sélectifs de COX-2 devraient offrir un meilleur rapport bénéfice/risque que les AINS classiques.*

également le principe d'une inhibition d'interaction lente de COX-2 et d'une inhibition compétitive de COX-1[14,50].

Activités anti-inflammatoire et antalgique des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Si le profil d'expression de COX-1 et COX-2 suggère un rôle prépondérant de COX-2 dans la réaction inflammatoire, on ne peut, sur la base de ces seules données biochimiques, exclure la participation de COX-1[51-53]. Les résultats pharmacologiques obtenus dans divers modèles animaux d'inflammation aiguë ou chronique montrent toutefois que les inhibiteurs sélectifs de COX-2 exercent une activité anti-inflammatoire comparable à celle des AINS non sélectifs[54-58]. De plus, un inhibiteur sélectif de COX-1 s'est avéré être inactif sur un modèle d'inflammation et d'hyperalgie à la carragénine chez le rat[59]. Ces résultats expérimentaux soutiennent l'hypothèse d'une intervention quasi-exclusive de COX-2, du moins dans les modèles animaux utilisés[15,17,60]. Par ailleurs, des résultats cliniques préliminaires démontrent, pour le celecoxib et le rofécoxib, une efficacité comparable à celle des AINS classiques dans le traitement de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde[40,61]. L'ensemble de ces données confirme l'intérêt thérapeutique d'une inhibition sélective de COX-2 dans le traitement des pathologies inflammatoires.

Les données sur le rôle de COX-2 dans la douleur sont plus équivoques que dans l'inflammation. Dans le modèle d'hyperalgie induite par la carragénine chez le rat, on note une surexpression de COX-2, au site inflammatoire et dans la moelle épinière[62]. Les AINS classiques et les inhibiteurs sélectifs de COX-2, mais pas les inhibiteurs sélectifs de

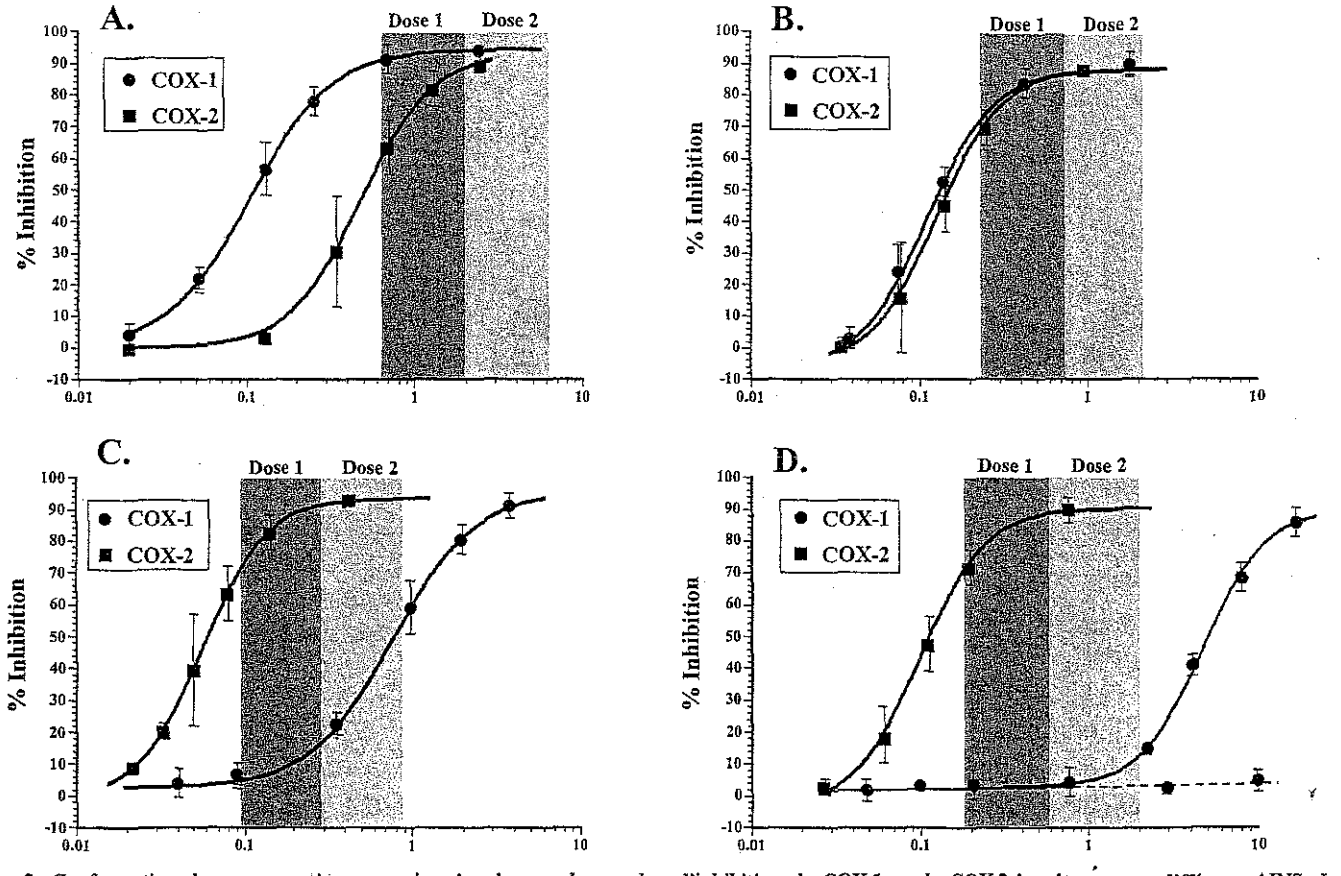


Fig. 2. Confrontation des concentrations sanguines in vivo *et des courbes d'inhibition de COX-1 et de COX-2* in vitro, *pour différents AINS. Les concentrations sanguines sont indiquées par les zones hachurées, pour deux posologies. (A) : certains AINS classiques sont plus actifs sur COX-1 que sur COX-2. Aux concentrations plasmatiques efficaces, ils inhibent toutefois les deux enzymes de façon sub-maximale. (B) : la plupart des AINS classiques inhibent COX-1 et COX-2 de façon comparable. (C) : certains produits actuellement sur le marché sont plus actifs vis-à-vis de COX-2 que de COX-1. Cette différence d'activité peut se traduire par une sélectivité* in vivo, *aux doses thérapeutiques les plus faibles (Dose 1), mais pas aux doses les plus élevées (Dose 2). (D) Pour certains produits en cours d'enregistrement, la sélectivité* in vitro *est suffisante pour se traduire également* in vivo, *aux différentes doses utilisées. Idéalement, un inhibiteur spécifique de COX-2 devrait être dépourvu d'activité sur COX-1 (courbe en pointillé).*

COX-1, sont actifs[32,59,63-65], suggérant l'intervention quasi-exclusive de COX-2 dans ce modèle. De même, COX-2 paraît jouer un rôle prépondérant dans l'hyperalgie accompagnant l'arthrite à l'adjuvant de Freund chez le rat[66]. Dans le test au formol en revanche, les AINS classiques ont une activité antalgique supérieure à celle des inhibiteurs sélectifs de COX-2, administrés par voie orale ou spinale[67,68]. Il en est de même dans le modèle de douleur viscérale induite par l'injection intrapéritonéale d'acide acétique chez le rat[69]. En conclusion, COX-2 semble intervenir de facon quasi-exclusive dans les modèles de douleur inflammatoire alors que COX-1 interviendrait de façon prépondérante dans les modèles aigüs d'irritation chimique dans les conditions expérimentales décrites. En clinique, les inhibiteurs sélectifs de COX-2 ont été comparés à divers AINS, dans plusieurs modèles de douleur d'origine inflammatoire. Le pouvoir antalgique du celecoxib est comparable à celui du naproxène (500 mg 2 × /j) dans l'arthrose aux posologies de 100 et 200 mg 2 × /j et dans la poylarthrite rhumatoïde aux posologies de 100, 200 et 400 mg 2 × /j. 200 mg 2 × /j de celecoxib est également comparable à 150 mg/j de diclofénac dans la polyarthrite rhumatoïde et à 650 mg d'aspirine dans des modèles d'extraction dentaire[40,70-72]. Aux doses de 50 et 100 mg, le pouvoir antalgique du rofécoxib est comparable à celui de 400 mg d'ibuprofène et 550 mg de naproxène dans des modèles d'extraction dentaire[44,73]. Le pouvoir antalgique de ce produit dans la coxarthrose et la gonarthrose est, aux posologies quotidiennes de 12.5 et 25 mg, comparable à celui de 150 mg de diclofénac[74]. L'ensemble de ces travaux semble indiquer que les inhibiteurs sélectifs de COX-2 sont aussi efficaces que les AINS de référence aux posologies habituelles dans les principaux syndromes douloureux recontrés en clinique.

Tolérance digestive des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Les lésions digestives des AINS classiques sont principalement des lésions intestinales chez l'animal et, à un degré moindre, des lésions gastriques ; elles conduisent à des hémorragies digestives et à des perforations gastro-intestinales entraînant la mort. Chez l'homme, les lésions sont essentiellement gastro-duodénales à type d'érosion ou d'ulcère. Les lésions intestinales, classiquement silencieuses, ne doivent toutefois pas être sous-estimées. Dans la muqueuse normale, la synthèse de prostaglandines cytoprotectrices dépend principalement de l'activité de COX-1, ce qui laisse présager d'une meilleure tolérance digestive des inhibiteurs sélectifs de COX-2. En accord avec cette hypothèse, des études chez le rat montrent que des inhibiteurs sélectifs de COX-2 n'induisent pas de lésions digestives à des posologies nettement supérieures aux posologies anti-inflammatoires chez cette espèce[54,57]. Ces produits n'induisent pas non plus de saignements digestifs chez le ouistiti[57]. La meilleure tolérance digestive des inhibiteurs sélectifs de COX-2 a également été démontrée lors d'études de toxicité chronique, réalisées chez le chien, avec les produits en cours d'enregistrement.

Nous disposons actuellement de peu d'études cliniques publiées s'intéressant spécifiquement à la tolérance digestive des inhibiteurs sélectifs de COX-2. Des études endoscopiques, réalisées avec le celecoxib et le rofécoxib chez le volontaire sain et chez des patients souffrant d'arthrose ou de polyarthrite rhumatoïde, ont mis en évidence une incidence d'ulcères gastro-duodénaux comparable à celle observée sous placebo et significativement inférieure à celle observée sous AINS classiques[40,75,76]. De même, lors d'essais cliniques réalisés avec le celecoxib, significativement moins d'effets indésirables digestifs sont observés qu'avec les AINS classiques. Ces différences portent aussi bien sur les effets mineurs (de type douleur abdominale ou dyspepsie) que sur les troubles plus graves (de type perforation, ulcère ou hémorragie)[77]. Des études de phase IV avec des inhibiteurs sélectifs de COX-2 ne sont pas encore disponibles. Deux larges études multicentriques viennent toutefois d'être publiées avec un 'inhibiteur préférentiel' de COX-2, le méloxicam. Ces deux études portant sur 18 000 patients souffrant d'arthrose, ont comparé le méloxicam, à la dose de 7.5 mg/j connue pour préserver l'activité de COX-1, au diclofénac LP 100 mg/j et au piroxicam 20 mg/j. L'incidence des effets indésirables de type vomissement, douleur abdominale, diarrhée ou dyspepsie, était significativement inférieure chez les patients traités par le méloxicam[78,79]. La durée du traitement (4 semaines) ne permettait toutefois pas de mettre en évidence de différence significative (tendance en faveur du méloxicam) entre les traitements pour les effets indésirables de type perforation, ulcère ou hémorragie digestive.

Si les inhibiteurs sélectifs de COX-2 semblent présenter une meilleure tolérance digestive que les AINS classiques dans les études cliniques réalisées à ce jour, il faut souligner le peu de données chez des patients à risque majoré (patients ayant un ulcère gastroduodénal en cours d'évolution ou ayant des antécédents récents d'ulcère). Même si des études endoscopiques avec le rofécoxib et le celecoxib ont inclus des patients à risque majoré, et tendent à démontrer une meilleure tolérance digestive de ces produits par rapport aux AINS classiques, la prudence s'impose dans ce domaine. La prudence s'impose puisque des travaux expérimentaux suggèrent un rôle de COX-2 dans le processus de cicâtrisation des ulcères digestifs[80-82a,b].

En conclusion, l'évaluation de la tolérance digestive est un aspect fondamental du développement des inhibiteurs sélectifs de COX-2. Une standardisation des protocoles d'étude est indispensable. Après commercialisation, le suivi des effets indésirables digestifs graves sera bien entendu indispensable avec évaluation en particulier de l'évolution de

l'incidence des hémorragies digestives qui représentent le principal problème de santé publique.

Autres effets indésirables des AINS : avantages potentiels des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Les AINS classiques sont soumis à certaines précautions d'emploi qui tiennent compte des effets de ces molécules sur diverses fonctions physiologiques, comme les fonctions rénale et cardiovasculaire et la fonction de reproduction. Les effets observés semblent dépendre d'une inhibition de la synthèse des prostaglandines. Il faut rappeler que les AINS classiques bloquent, aux posologies habituelles, à la fois COX-1 et COX-2. Les effets indésirables d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 devraient être, dans le cas le plus défavorable, comparables à ceux des AINS, mais *a priori* pas différents ou supérieurs à posologie équivalente. La fonction cardiovasculaire, et particulièrement le rapport TxA_2 plaquettaire/ PGI_2 endothéliale, pourrait toutefois constituer une exception.

Fonction rénale

Alors que l'implication des PGs dans la fonction rénale normale est minime, une situation d'hypoperfusion induit une synthèse accrue de PGs qui jouent alors un rôle majeur dans le maintien de la filtration glomérulaire[83–86]. Ce rôle est à rattacher essentiellement à un effet vasodilatateur des PGs impliquées (en particulier PGE_2) ainsi qu'à une action sur la production de rénine et le transport hydrosodé. Cela explique que la néphrotoxicité associée à la prise d'AINS classiques, faible chez les sujets jeunes et en bonne santé, puisse atteindre 20 pour cent chez les patients âgés ou souffrant de pathologies qui s'accompagnent d'une hypoperfusion rénale (insuffisance cardiaque, troubles vasculaires, hémorragie, choc septique, hépatite grave, pathologie rénale pré-existante)[83–86]. Les rôles respectifs d'une inhibition de COX-1 ou de COX-2 dans la néphrotoxicité des AINS sont peu connus. Les deux iso-enzymes sont exprimées de façon constitutionnelle dans le tissu rénal chez l'homme comme chez l'animal avec cependant une distribution différente entre les espèces. Dans des conditions physiologiques, la synthèse de PGs par le rein semble dépendre de l'activité de COX-1. COX-2 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la libération de rénine[17,18,86–90]. Le rôle de COX-2 au cours de l'embryogenèse et de la différenciation postnatale a été démontré chez des souris génétiquement déficientes en cette enzyme[52]. Cela ne devrait toutefois pas préjuger de la tolérance d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 administrés à des patients adultes. Quoi qu'il en soit, et compte tenu du peu de données disponibles sur les effets d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans des modèles animaux présentant une filtration glomérulaire diminuée ou chez des patients à risque majoré, nous ne pouvons pour l'instant conclure à une meilleure tolérance rénale de ces produits par rapport aux AINS classiques[86,91,92].

Fonction reproductrice

La participation des prostaglandines aux principales étapes de la reproduction que sont l'ovulation, la fécondation, l'implantation, et l'accouchement, est connue depuis de nombreuses années. Des travaux visant à élucider les mécanismes de contrôle de la synthèse de PGs par l'ovaire ont d'ailleurs contribué à la découverte de COX-2[93,94]. Dans l'ovaire, COX-2 est responsable de la synthèse de PGs qui entraînent la rupture du follicule puis l'ovulation. Le rôle de COX-2 dans l'ovulation a par ailleurs été confirmé chez des souris génétiquement déficientes en COX-2 qui présentent des troubles sévères de l'ovulation[51,52,95]. Il est également probable que COX-2 soit l'iso-enzyme responsable de la maturation des complexes cumulus–ovocytes qui joue un rôle prépondérant dans la fécondation[95,96]. Les premières étapes de la réaction d'attachement de l'embryon à l'utérus sont également caractérisées par une surexpression de COX-2 dans l'épithélium luminal et le stroma sous-jacent chez la souris[97], les ruminants[98,99], et probablement la femme[100]. Le rôle de COX-2 dans l'implantation et la décidualisation est illustré par les échecs d'implantation entraînant une complète stérilité des souris déficientes en COX-2[95]. Le défaut de développement de certains organes chez ces souris souligne par ailleurs le rôle de COX-2 au cours de l'embryogenèse[51,52]. Les tissus utérins et foetaux élaborent des quantités croissantes de prostaglandines depuis la moitié de la gestation jusqu'au terme. Cependant, c'est dans les jours qui précèdent l'accouchement que les concentrations de PGs augmentent considérablement. L'augmentation exponentielle de COX-2 à l'approche du terme suggère que cette iso-enzyme est impliquée dans l'initiation de l'accouchement[22,101–103]. Compte tenu du rôle de COX-2 dans le contrôle des fonctions reproductrices, la prescription d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 est déconseillée durant les premiers mois (implantation, embryogenèse) et les derniers mois (risque d'accouchement retardé) de la gestation, comme c'est le cas pour les AINS classiques. L'influence d'une inhibition de COX-2 sur les effets contragestifs des dispositifs intra-utérins n'a pas été étudiée.

Asthme

10 pour cent des patients asthmatiques développent une crise d'asthme lors de la prise d'AINS. 40 pour cent de ces patients présentent également des polypes nasaux et/ou une rhinite (syndrome de Fernand-Widal). Cette intolérance aux AINS n'est pas d'ordre immunologique puisqu'il n'y a pas production d'anticorps spécifiques (IgE), et puisque tous les AINS sont concernés, quelle que soit leur famille chimique. L'hypothèse la plus probable est une déviation du métabolisme de l'acide arachidonique vers la

synthèse de leucotriènes suite à l'inhibition de l'activité cyclooxygénasique. Cette hypothèse s'appuie sur les observations suivantes : (1) on note une production accrue de leucotriènes (LTs), principalement LTC_4 et LTD_4, lors d'un test de provocation à l'aspirine chez les patients intolérants aux AINS[104], (2) les leucotriènes sont des médiateurs reconnus de l'asthme[105], (3) parmi les patients souffrant d'asthme, ceux présentant une intolérance aux AINS ont une activité leucotriène C_4 synthétase exacerbée[106], (4) les médicaments bloquant la synthèse ou l'activité des leucotriènes sont actifs dans le traitement de la crise d'asthme induite par les AINS[107–109]. En quoi les inhibiteurs sélectifs de COX-2 pourraient-ils être différents des AINS classiques ? Des données expérimentales chez le rat montrent que les inhibiteurs sélectifs de COX-2, contrairement aux AINS, ne stimulent pas la synthèse de leucotriènes[110]. En l'absence d'études cliniques chez des patients intolérants aux AINS, il est toutefois trop tôt pour conclure à une meilleure tolérance de ces produits.

Fonctions cardiovasculaire et plaquettaire

En bloquant la synthèse de PGs vasodilatatrices (PGE_2 et PGI_2), les AINS peuvent s'opposer aux effets de médicaments antihypertenseurs, et aggraver certaines pathologies comme l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque[111–114]. En l'absence de données pharmacologiques ou cliniques, nous ne pouvons conclure à une plus grande sécurité d'emploi des inhibiteurs sélectifs de COX-2. COX-1 étant la seule isoenzyme présente dans les plaquettes, les effets des AINS sur l'agrégation plaquettaire (effets indésirables ou recherchés) sont exclusivement liés à l'inhibition de cette isoenzyme[115]. COX-2 serait en revanche responsable de la synthèse de prostacycline par les cellules endothéliales[45]. Une inhibition sélective de COX-2 pourrait modifier le rapport TxA_2/PGI_2 en faveur de la synthèse de thromboxane plaquettaire[45]. Cet aspect mérite d'être étudié de façon approfondie chez des patients souffrant de pathologies vasculaires oblitérantes.

Système nerveux central (SNC)

COX-1 et COX-2 sont exprimées de façon constitutionnelle dans le SNC[26,116–118] et pourraient donc avoir un rôle physiologique à ce niveau. Les études comportementales chez l'animal et les observations cliniques ne font toutefois pas mention d'effets indésirables centraux majeurs liés à l'administration d'inhibiteurs sélectifs de COX-2.

Nouvelles indications thérapeutiques potentielles des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Si une plus grande sécurité d'emploi des inhibiteurs sélectifs de COX-2 devait se confirmer à long terme, ces substances pourraient connaître une extension de leurs indications. En effet, en dehors de l'inflammation, COX-2 semble être également impliquée dans différentes pathologies comme l'accouchement prématuré, le cancer du côlon et la maladie d'Alzheimer. Un domaine restera toutefois l'apanage d'une inhibition sélective de COX-1, et plus particulièrement de l'aspirine à faible posologie, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

Accouchement prématuré

Administrées à tout stade de la gestation, les PGs provoquent l'accouchement ou l'avortement. A l'opposé l'administration d'AINS permet d'atténuer les contractions utérines et de retarder la délivrance. Ces effets des AINS pourraient être exploités dans la prévention de certains accouchements prématurés s'ils ne s'accompagnaient d'effets indésirables sévères pour le foetus, en particulier le développement d'un hydramnios et la fermeture précoce du canal artériel[23]. L'augmentation exponentielle de COX-2 dans les jours qui précèdent le terme suggère que cette iso-enzyme contrôle la synthèse des PGs qui provoquent l'accouchement[22,101–103]. Les PGs responsables du contrôle de la fonction rénale foetale et du maintien de la perméabilité du canal artériel semblent par contre dépendre de l'activité de COX-1. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 devrait donc permettre de prévenir les accouchements prématurés avec moins d'effets indésirables pour le foetus que les AINS classiques[23]. Des résultats cliniques préliminaires, obtenus avec un 'inhibiteur préférentiel' de COX-2, le nimésulide, tendent à confirmer cette hypothèse[119]. Ils doivent être confirmés à plus grande échelle et avec des inhibiteurs présentant une plus grande sélectivité.

Cancer rectocolique

Plusieurs études épidémiologiques, rétrospectives cas témoins ou prospectives, suggèrent que la prise régulière d'AINS réduit l'incidence du cancer rectocolique ou la mortalité par cette maladie[120,121]. Par ailleurs, des essais cliniques réalisés chez des patients souffrant de polypose familiale montrent qu'un traitement par le sulindac réduit le nombre et le volume des polypes, du moins pendant la durée du traitement[121]. Enfin, des études dans des modèles expérimentaux de polypose familiale (souris *Min* ou souris $Apc^{\Delta 716}$ mutées sur le gène suppresseur de tumeur *Apc*) ou de tumeurs induites par des carcinogènes chimiques (azoxyméthane, diméthylhydrazine) montrent un effet préventif des AINS classiques sur le nombre et le volume des lésions cancéreuses[122]. Dans les modèles animaux comme chez l'homme, les tissus pathologiques présentent une expression accrue de COX-2 et une production exagérée de PGs[21,123]. Même s'il n'existe pas de corrélation évidente

entre le niveau d'expression de COX-2 et le stade tumoral, le rôle de COX-2 dans la cancérogenèse est fortement suggéré, d'autant que la plupart des lignées cancéreuses colorectales humaines expriment fortement cette isoenzyme[124]. Plusieurs types d'expériences ont permis de démontrer une implication probable de COX-2 : (1) sa surexpression par transfection transitoire de cellules intestinales ou colorectales induit une résistance à l'apoptose et une augmentation du potentiel invasif de ces cellules[125–127], (2) la délétion du gène de COX-2 chez des souris *Apc*^{A716} provoque une diminution importante du nombre et du volume des polypes[128], (3) les inhibiteurs sélectifs de COX-2 réduisent les lésions et/ou la croissance tumorale dans la plupart des modèles animaux utilisés : polypose[128], carcinogenèse chimique[129,130] et xénogreffes[131]. Il est toutefois trop tôt pour conclure que les effets chimiopréventifs des AINS sont dus exclusivement à l'inhibition de COX-2. D'autres mécanismes, dépendants de COX-1 ou indépendants de toute activité cyclooxygénasique, ont été proposés[132,133]. Quoi qu'il en soit, des inhibiteurs sélectifs de COX-2 sont en cours d'évaluation clinique dans la polypose familiale. En fonction des résultats obtenus, ils seront ou non évalués dans la prévention du cancer rectocolique.

Maladie d'Alzheimer

Comme pour le cancer rectocolique, les premières données suggérant un rôle de COX-2 dans la maladie d'Alzheimer furent des donnés épidémiologiques. Plusieurs études ont montré en effet que la prise régulière d'AINS diminue la progression ou retarde l'apparition de cette maladie[134]. L'étude post-mortem de l'expression de COX-1 et COX-2, a généré des résultats contradictoires[25]. Le rôle de COX-2 dans la maladie d'Alzheimer s'appuie sur deux hypothèses : (1) l'expression de COX-2 est induite dans les cellules gliales par des stimuli inflammatoires et pourrait ainsi participer à l'inflammation cérébrale caractéristique de la maladie d'Alzheimer[135,136], (2) COX-2 pourrait également être impliquée dans l'induction de la mort neuronale[137–140]. Les études cliniques en cours avec des inhibiteurs sélectifs de COX-2 permettront de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses.

Conclusion

Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 semblent tenir la promesse d'une meilleure tolérance digestive, tout en ayant des propriétés anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique comparables à celles des AINS classiques. Leurs effets chez des patients souffrant d'un ulcère évolutif ou ayant des antécédents récents d'ulcère ainsi que chez des patients présentant des pathologies rénale ou cardiovasculaire concomitantes doivent encore être évalués de façon approfondie. En effet, un médicament se prévalant d'une meilleure tolérance expose au risque d'une prescription systématique chez des patients à risque majoré. Ceci souligne l'importance (1) d'un contrôle strict des prescriptions et (2) des études de pharmacovigilance qui seules permettront d'évaluer la sécurité d'emploi à long terme de ces produits. L'extension de la prescription d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 à d'autres indications comme le cancer colorectal ou la maladie d'Alzheimer ne pourra être envisagée que sur la base d'un rapport bénéfice/risque à long terme clairement défini.

Ce travail est dédié à la mémoire de J. Maclouf.

Références

1. CSM. (Commitee on the Security of Medicines) Update. Non-steroidal antiinflammatory drugs and serious gastrointestinal adverse reactions. *BMJ* 1986; 292: 1190–1191.
2. Fries JF. NSAID gastropathy: the second most deadly rheumatic disease? Epidemiology and risk appraisal. *J Rheumatol* 1991; 18 (suppl 28): 6–10.
3. Griffin MR. Epidemiology of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal injury. *Am J Med* 1998; 104 (suppl 3A): 23S–29S.
4. Garcia Rodriguez LA, Jick H. Risks of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 1994; 343: 769–772.
5. Langmann MJ, Weil J, Wainwright P *et al.* Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 1994; 343: 1075–1078.
6. Henry DH, Lim LL-Y, Garcia Rodriguez LA *et al.* Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. *BMJ* 1996; 312: 1563–1566.
7. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. *Nature (New Biol.)* 1971; 231: 232–235.
8. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K *et al.* The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990; 265: 16737–16740.
9. Vane JR. Towards a better aspirin. *Nature* 1994; 367: 215–216.
10. Pairet M, Engelhardt G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fund Clin Pharmacol* 1996; 10: 1–15.
11. Berenbaum F. Les cyclooxygénases et leurs inhibiteurs. *Rev Rhum* 1998; 65: 701–708.
12. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 1994; 367: 243–249.
13. Kurumbail R, Stevens AM, Gierse JK *et al.* Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996; 384: 644–648.

14. Luong C, Miller A, Barnett J *et al.* Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nature Struct Biol* 1996; 3: 927–933.
15. Jouzeau JY, Terlain B, Abid A *et al.* Cyclo-oxygenases isoenzymes: how recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs* 1997; 53: 563–582.
16. Dubois R, Abramson S, Crofford L *et al.* Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; 12: 1063–1073.
17. Pairet M, van Ryn J, Distel M. Overview of COX-2 in inflammation: from the biology to the clinic. *In:* Willoughby D, Tomlinson A, eds. *Progress in Inflammation: Inducible Enzymes in the Inflammatory Response.* Basel: Birkhäuser, 1998: 1–30.
18. Sano H, Hla T, Maier *et al. In vivo* cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and in rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J Clin Invest* 1992; 89: 97–108.
19. Crofford LJ. Cyclooxygenase-1 and -2 in synovial tissues of arthritic patients. *In:* Vane JR, Botting RM, eds. *Clinical Significance and Potential of Selective COX-2 Inhibitors.* London: William Harvey Press, 1998: 41–48.
20. Siegle I, Klein R, Backman JT *et al.* Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue. Differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 122–129.
21. Eberhardt CE, Coffey RJ, Radhika A *et al.* Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183–1188.
22. Slater DM, Berger L, Newton R *et al.* Changes in expression of types 1 and 2 cyclo-oxygenase in human fetal membranes at term. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 14: 237–244.
23. Bennett P, Sawdy R, Slater D. The role of cyclooxygenase-2 in reproduction. *In:* Vane JR, Botting RM, eds. *Clinical Significance and Potential of Selective COX-2 Inhibitors.* London: William Harvey Press, 1998: 171–183.
24. Oka A, Takashima S. Induction of cyclooxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and dementia of the Alzheimer's type: specific localization in affected neurones and axons. *Neuroreport* 1997; 8: 1161–1164.
25. O'Banion MK. Cyclooxygenase-2 in Alzheimer's disease. *In:* Vane JR, Botting RM, eds. *Clinical Significance and Potential of Selective COX-2 Inhibitors.* London: William Harvey Press, 1998: 185–192.
26. Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J *et al.* COX-2, a synaptically-induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2317–2321.
27. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 1993; 330: 156–160.
28. Harris RC, McKanna, JA, Akai Y *et al.* Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994; 94: 2504–2510.
29. 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; 47 (Suppl 2): S93–S101.
30. Copeland RA, Williams JM, Giannaras J *et al.* Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1994; 91: 11202–11206.
31. Ouellet M, Percival MD. Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem J* 1995; 306: 247–251.
32. Riendeau D, Percival MD, Boyce S *et al.* Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 105–117.
33. Riendeau D, Charleson S, Cromlish *et al.* Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelets assays. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 1088–1095.
34. Patrignani P, Panara MR, Greco A *et al.* Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271: 1705–1712.
35. Brideau C, Kargman, Liu S *et al.* A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm Res* 1996; 45: 68–74.
36. Stichtenoth DO, Wagner B, Frölich JC. Effects of meloxicam and indomethacin on cyclooxygenase pathways in healthy volunteers. *J Invest Med* 1997; 45: 44–49.
37. Cullen L, Kelly L, Connor SO *et al.* Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 578–582.
38. Panara MR, Padovano R, Sciulli MG *et al.* Effects of nimesulide on constitutive and inducible prostanoid biosynthesis in human beings. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63: 672–681.
39. Steinhaeuslin F, Munajo A, Buclin T *et al.* Renal effects of nimesulide in furosemide-treated subjects. *Drugs* 1993; 46 (suppl 1): 257–262.
40. Simon LS, Lanza FL, Lipsky PE *et al.* Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1591–1602.
41. Mengle-Gaw L, Hubbard R, Karim A *et al.* A study of the platelet effects of SC58635, a novel COX-2 selective inhibitor (abstract). *Arthritis Rheum* 1997; 40 (suppl 9): A 374.
42. Ehrich E, Dallob A, van Hecken A *et al.* Demonstration of selective COX-2 inhibition by MK-966 in humans (abstract). *Arthritis Rheum* 1996; 39 (suppl 9): A 328.

43. Depré M, Ehrich E, DeLepeleire I *et al.* Demonstration of specific COX-2 inhibition by MK-966 (VIOXX®) in humans with supratherapeutic doses (abstract). *Rheum Eur* 1998; 27 (suppl 2): 118 (A196).

44. Ehrich EW, Dallob A, Delepeleire I *et al.* Characterization of Rofecoxib as a cyclooxygenase 2 isoform inhibitor and demonstration of analgesia in the dental pain model. *Clin Pharmacol Ther* 1998 (sous presse).

45. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA *et al.* Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 1: 272-277.

46. Gierse JK, McDonald JJ, Hauser SD *et al.* 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; 271: 15810-15814.

47. Wong E, Bayly C, Waterman HL *et al.* 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; 272: 9280-9286.

48. Browner MF. The structure of human COX-2 and selective inhibitors. *In*: Vane JR, Botting J eds. *Selective COX-2 Inhibitors: Pharmacology, Clinical Effects and Therapeutic Potential.* London: Kluwer Academic Publishers and William Harvey Press, 1998: 19-26.

49. Picot D. The three-dimensional structure of cyclooxygenases. *In*: Szczeklick A, Gryglewski RJ, Vane JR, eds. *Eicosanoids, Aspirin and Asthma.* New York: Marcel Dekker, 1998: 161-186.

50. So OY, Scarafia LE, Mak AY *et al.* The dynamics of prostaglandin H synthases. Studies with prostaglandin H synthase 2 Y355F unmask mechanisms of time-dependent inhibition and allosteric activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 5801-5807.

51. Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ *et al.* Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 1995; 378: 406-409.

52. Morham SG, Langenbach R, Loftin CD *et al.* Prostaglandin synthase gene disruption can cause severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995; 83: 473-482.

53. Wallace JL, Bak A, McKnight W *et al.* Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. *Gastroenterology* 1998; 115: 101-109.

54. Futaki N, Yoshikawa K, Hamasaka Y *et al.* NS-398, a novel non-steroid anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. *Gen Pharmacol* 1993; 24: 105-110.

55. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT *et al.* Selective inhibition of inducible cyclooxygenase *in vivo* is anti-inflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3228-3232.

56. Seibert K, Zhang Y, Leahy *et al.* Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12013-12017.

57. Chan CC, Boyce S, Brideau C *et al.* 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; 274: 1531-1537.

58. Anderson GD, Hauser SC, McGarity KL *et al.* Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 1996; 97: 2672-2679.

59. Smith CJ, Zhang Y, Koboldt C *et al.* Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13313-13318.

60. van Ryn J, Pairet M. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: pharmacology, clinical effects and therapeutic potential. *Exp Opin Invest Drugs* 1997; 6: 609-614.

61. Ehrich E, Schnitzer T, Weaver *et al.* Treatment with MK-0966 (VIOXX®), a specific COX-2 inhibitor, resulted in clinical improvement in osteoarthritis (OA) of the knee and hip, that was sustained over six months (abstract). *Rheum Eur* 1998; 27 (suppl. 2): 119 (A198).

62. Hay C, de Belleroche J. Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport* 1997; 8: 1249-1251.

63. Matsushita M, Masaki M, Yagi Y *et al.* Pharmacological profile of JTE-522, a novel prostaglandin H synthase inhibitor, in rats. *Inflamm Res* 1997; 46: 461-466.

64. Zhang Y, Schaffer A, Portanova J *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 1069-1075.

65. Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL. Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 1031-1038.

66. Hay C, Trevethick MA, Wheeldon A *et al.* The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. *Neuroscience* 1997; 78: 843-850.

67. Dirig DM, Konin GP, Isakson PC, Yaksh TL. Effect of spinal cyclooxygenase inhibitors in rat using the formalin test and *in vitro* prostaglandin E2 release. *Eur J Pharmacol* 1997; 331: 155-160.

68. Euchenhofer C, Mailhoefner C, Brune K *et al.* Differential effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS 398 and diclofenac on formalin-induced nociception in the rat. *Neurosci Lett* 1998; 248: 25-28.

69. Kusuhara H, Fukunari A, Matsuyuki H, Okumoto T. Principal involvement of cyclooxygenase-1-derived prostaglandins in the c-fos expression of the rat hind brain following visceral stimulation with acetic acid. *Mol Brain Res* 1997; 52: 151-156.

70. Geis GS, Hubbard R, Callison D *et al.* Safety and efficacy of Celecoxib, a specific COX-2 inhibitor, in patients with rheumatoid arthritis (abstract). *Arthritis Rheum* 1998; 41 (suppl. 9): S 364 (A 1990).

71. Hubbard R, Geis GS, Woods E *et al.* Efficacy, tolerability, and safety of Celecoxib, a specific COX-2 inhibitor, in osteoarthritis (abstract). *Arthritis Rheum* 1998; 41 (suppl 9): S196 (A 982).

72. Lane NE. Pain management in osteoarthritis: the role of COX-2 inhibitors. *J Rheumatol* 1997; 24 (suppl 49): 20–24.

73. Mehlisch DR, Mills S, Sandler M *et al. Ex vivo* assay of COX-2 inhibition predicts analgesic efficacy in post-surgical dental pain with MK-966 (abstract). *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63 (2): 139.

74. Cannon G, Caldwell J, Holt P *et al.* MK-0966, a specific COX-2 inhibitor, has clinical efficacy comparable to diclofenac in the treatment of knee and hip osteoarthritis (OA) in a 26 week controlled clinical trial (abstract). *Arthritis Rheum* 1998; 41 (suppl. 9): S196(A983).

75. Lanza FL, Rack MF, Callison DA *et al.* A pilot endoscopic study of the gastroduodenal effects of SC-58635, a novel COX-2 selective inhibitor (abstract). *Gastroenterology* 1997; 112: A194.

76. Lanza FL, Simon T, Quan H *et al.* Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) with MK-0966 (250 mg Q.I.D.) is associated with less gastroduodenal damage than aspirin (ASA) 650 mg Q.I.D. or ibuprofen (IBU) 800 mg T.I.D. (abstract). *Gastroenterology* 1997; 112: A194.

77. Le Loet X, Kahan A, Tebib J *et al.* Tolérance gastrique et duodénale endoscopique du célécoxib, inhibiteur spécifique de la COX-2, versus diclofénac dans la polyarthrite rhumatoide, en phase III (abstract). *Rev Rhum* 1998; 11: 816 (B134).

78. Hawkey C, Kahan A, Steinbrück *et al.* Gastrointestinal tolerability of meloxicam compared to diclofenac in osteoarthritis patients. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 937–945.

79. Dequeker J, Hawkey, Kahan A *et al.* 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; 37: 946–951.

80. Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K *et al.* Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by specific antagonists delays healing in mice. *Gastroenterology* 1997; 112: 387–397.

81. Shigeta JC, Takahashi S, Okabe S. Role of cyclooxygenase-2 in the healing of gastric ulcers in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 1383–1390.

82a. Zimmermann KC, Sarbia M, Schrör K *et al.* Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Molec Pharmacol* 1998; 54: 536–540.

82b. Laine L, Hawkey C, Harper C *et al.* Effect of the COX-2 specific inhibitor (C-255) rofecoxil on diet formation: a double-blind comparison with ibuprofein. *Gastroenterology* (Abstract) 1999; 116: A229.

83. Bennett WM, Henrich WL, Stoff JS. The renal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: summary and recommendations. *Am J Kidney Dis* 1996; 28(suppl 1): S56–S62.

84. Wen SF. Nephrotoxicities of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Formos Med Assoc* 1997; 96 (3): 157–171.

85. Whelton A. Renal effects of over-the-counter analgesics. *J Clin Pharmacol* 1995; 35: 454–463.

86. Stichtenoth DO, Froelich JC. Avoidance of renal side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: value of selective cyclooxagenase-2 inhibition. *In*: Vane JR, Botting RM eds. *Clinical Significance and Potential of Selective COX-2 Inhibitors.* London: William Harvey Press, 1998: 99–108.

87. Venturini CM, Isakson P, Needleman P. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced renal failure: a brief review of the role of cyclo-oxygenase isoforms. *Curr Opin Nephrol Hypertension* 1998; 7: 79–82.

88. Kömhoff M, Gröne HJ, Klein T *et al.* Localization of cyclooxygenase-1 and 2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol* 1997; 272: F460–F468.

89. Hartner A, Goppelt-Struebe M, Hilgers KF. Coordinate expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney in renovascular hypertension. *Hypertension* 1997; 31: 201–205.

90. Tomasoni S, Noris M, Zapella S *et al.* Upregulation of renal and systemic cyclooxygenase-2 in patients with active lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1202–1212.

91. De Forrest JM, Davis JO, Freeman RH *et al.* Effects of indomethacin and meclofenamate on renin release and renal hemodynamic function during chronic sodium depletion in conscious dogs. *Circulation Res* 1980; 47: 99–107.

92. Brooks DP, Adams J, DePalma PD *et al.* The selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, but not 6-MNA, affects renal hemodynamic and renal function in the dog. *J Rheumatol* (abstract) 1998; 25 (suppl 52): M64.

93. Hedin L, Gaddy-Kurten D, Kurten R *et al.* Prostaglandin endoperoxide synthase in rat ovarian follicles: content, cellular distribution and evidence for hormonal induction preceding ovulation. *Endocrinology* 1987; 121: 722–731.

94. Sirois J, Richard 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; 267: 6382–6388.

95. Lim H, Paria BC, Das SK *et al.* Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997; 91: 187–208.

96. Murdoch WJ. Disruption of cellular associations within the granulosa compartment of periovulatory ovine follicles: relationship to maturation of the oocyte and regulation by prostaglandins. *Cell Tissue Res* 1988; 252: 459–462.

97. Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK. Developmental expression of the cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* 1996; 16: 107–122.

98. Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP *et al.* Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in ovine endometrium *in vivo*. *Endocrinology* 1997; 138: 2163–2171.
99. Wu WX, Ma XH, Zhang Q *et al.* Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase 1 and 2 by estradiol and progesterone in nonpregnant ovine myometrium and endometrium *in vivo*. *Endocrinology* 1997; 138: 4005–4012.
100. Han SW, Lei ZM, Rao CV. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression by chorionic gonadotropin during the differentiation of human endometrial stromal cells into decidua. *Endocrinology* 1996: 137: 1791–1797.
101. Gibb W, Sun M. Localization of prostaglandin synthase type 2 protein and mRNA in term human fetal membranes and decidua. *J Endocrinol* 1996; 150: 497–503.
102. Wimsatt J, Nathanielsz PW, Sirois J. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase isoform-2 in ovine cotyledonary tissues during late gestation. *Endocrinology* 1993; 133: 1068–1073.
103. Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP *et al.* Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. *Biol-Reprod* 1997; 57: 1032–1040.
104. Szczeklik A, Sladek K, Dworski R *et al.* Bronchial aspirin challenge causes specific eicosanoid response in aspirin-sensitive asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1608–1614.
105. Busse W. The role and contribution of leukotrienes in asthma. *Ann Allerg Asthma Im* 1998; 81: 17–29.
106. Sanak M, Simon HU, Szczeklik A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. *Lancet* 1997; 350: 1599–1600.
107. Spector SL. Leukotriene activity modulation in asthma. *Drugs* 1997; 54: 369–384.
108. Calhoun WJ. Summary of clinical trials with Zafirlukast. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: S238–S246.
109. Markham A, Faulds D. Montelukast (ADIS New Drug Profile). *Drugs* 1998; 56: 251–256.
110. Schuligoi R, Amann R, Prenn C, Peskar BA. Effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 on thromboxane and leukotriene synthesis in rat peritoneal cells. *Inflamm Res* 1998; 47: 227–230.
111. Dzau VJ, Packer M, Lilly LS *et al.* Prostaglandins in severe congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984; 321: 347–352.
112. van den Ouweland FA, Gribnau FWJ, Meyboom RHB. Congestive heart failure due to nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the elderly. *Age and Aging* 1988; 17: 8–16.
113. van den Ouweland FA, Gribnau FWJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a prognostic factor in acute pulmonary oedema. *Arch Intern Med* 1987; 147: 178–179.
114. Whelton A, Hamilton CW. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: effects on kidney function. *J Clin Pharmacol* 1991; 31: 588–598.
115. Patrono C, Cipollone F, Renda G, Patrignani P. Cyclooxygenase enzymes in human vascular disease. *In*: Vane JR, Botting J eds. *Selective COX-2 Inhibitors: Pharmacology, Clinical Effects and Therapeutic Potential.* London: Kluwer Academic Publishers and William Harvey Press, 1998: 73–78.
116. Breder CD, Smith WL, Raz A *et al.* Distribution and characterization of cyclooxygenase immunoreactivity in the ovine brain. *J Comp Neurol* 1992; 322: 409–438.
117. Yamagata K, Andreasson, KI, Kaufmann WI *et al.* Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993; 11: 371–386.
118. Breder CD, DeWitt D, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 1995; 355: 196–315.
119. Sawdy R, Slater D, Fisk N *et al.* Use of a cyclooxygenase type-2-selective non-steroidal anti-inflammatory agent to prevent preterm delivery. *Lancet* 1997; 350: 265–266.
120. Thun MJ. NSAID use and decreased risk of gastrointestinal cancers. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25: 333–348.
121. Smalley WE, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997; 39: 1–20.
122. Little J. Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal neoplasia. *Int J Oncol* 1994; 5: 1151–1162.
123. Kargman S, O'Neill G, Vickers P *et al.* Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4816–4820.
124. Kutchera W, Jones DA, Matsunami N *et al.* Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon. *Cancer Res* 1995; 55: 1556–1559.
125. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83: 493–501.
126. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3336–3340.
127. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S *et al.* Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705–716.
128. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL *et al.* Suppression of intestinal polyposis in $Apc^{\Delta 716}$ knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell* 1996; 87: 803–809.
129. Reddy BS, Rao CV, Seibert K. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996; 56: 4566–4569.

130. Kawanori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 409–412.

131. Sheng H, Shao J, Kirkland SC *et al.* Inhibition of human colon cancer growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997; 99: 2254–2259.

132. Shiff SL, Rigas B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: evolving concepts of their chemopreventive actions. *Gastroenterology* 1997; 113: 1992–1998.

133. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mechanisms underlying nonsteroidal anti-inflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 681–686.

134. Breitner JCS. The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 1996; 47: 401–411.

135. O'Banion MK, Dusel JC, Chang JW *et al.* Interleukin-1β induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) in primary murine astrocyte cultures. *J Neurochem* 1996; 66: 2532–2540.

136. Bauer MKA, Lieb K, Schulze-Osthoff K *et al.* Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia. *Eur J Biochem* 1997; 243: 726–731.

137. Miettinen S, Fusco FR, Yrjänheikki J *et al.* Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid receptors and phospholipase A_2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6500–6505.

138. Ohtsuki T, Kitagawa K, Yamagata K *et al.* Induction of cyclooxygenase-2 mRNA in gerbil hippocampal neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Res* 1996; 736: 353–356.

139. Toco G, Freiremoar J, Schreiber SS *et al.* Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain–implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1997; 144: 339–349.

140. Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclooxygenase-2 gene expression in neurones contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 1997; 17: 46–55.

L'inhibition sélective de la cyclo-oxygénase de type 2 : une nouvelle vision des anti-inflammatoires non stéroïdiens

J.Y. Jouzeau*, H. Blain*, M. Daouphars*, P. Gillet*

LE REVERS DE LA MÉDAILLE DES AINS

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, que ce soit dans le contexte de la prescription médicale ou de celui de l'automédication. Leurs propriétés antipyrétiques, antalgiques et anti-inflammatoires en font un traitement symptomatique par excellence, ce qui explique leur succès d'estime auprès du public et leur large prescription dans les situations cliniques les plus diverses (arthrose, rhumatismes inflammatoires, douleurs dentaires, dysménorrhées, etc.). De plus, l'aspirine demeure un des traitements les plus efficaces dans la prévention des accidents thrombo-emboliques, en raison de ses propriétés inhibitrices de l'activation plaquettaire à faible posologie. Les AINS sont cependant considérés comme "une arme à double tranchant" *(1)* puisqu'ils forment également une des classes pharmacologiques les plus fréquemment citées pour leurs effets indésirables, dont certains sont potentiellement graves. On estime ainsi que les AINS sont responsables d'environ 260 000 hospitalisations et 26 000 décès par an dans le monde, avec une contribution prépondérante des effets indésirables digestifs graves (ulcères gastroduodénaux, complications graves de type hémorragies ou perforations) *(2)*. Même s'il existe des facteurs de risque bien identifiés (âge avancé, antécédent d'ulcère gastroduodénal, posologie élevée d'AINS, hypoperfusion rénale, etc.), les effets indésirables digestifs et, à un moindre degré, rénaux demeurent la principale limitation de l'utilisation prolongée des AINS classiques en rhumatologie *(3)*.

Les effets indésirables des AINS ne sont pas obligatoirement liés à leur mécanisme d'action et nombre d'entre eux semblent relever de mécanismes immunoallergiques (par exemple cutanés, hépatiques) ou, plus rarement, toxiques (par exemple phototoxicité) *(4)*. Dans ce contexte, la structure et/ou la réactivité chimiques de l'AINS peuvent jouer un rôle primordial, ce qui permet d'expliquer, au moins partiellement, la variabilité de fréquence de certains effets indésirables entre les molécules. En revanche, une des principales caractéristiques des effets indésirables digestifs des AINS serait de dépendre majoritairement de leur mécanisme d'action *(5)*. En effet, on sait depuis les travaux de Vane *(6)* que les AINS diminuent la biosynthèse des prostaglandines en inhibant la cyclo-oxygénase (COX), enzyme capable de biotransformer l'acide arachidonique issu des phospholipides membranaires. Dans la théorie de la double agression proposée par Schœn et Vender *(7)*, l'inhibition systémique de la biosynthèse des prostaglandines par les AINS serait prépondérante dans la survenue des lésions gastroduodénales car elle provoquerait, entre autres, une diminution de la sécrétion gastrique de bicarbonates et de mucus et une réduction du flux sanguin sous-muqueux (stase microcirculatoire). Cet effet systémique, observé quelle que soit la voie d'administration de l'AINS, serait moins impliqué dans la survenue des effets indésirables intestinaux *(8)*. Cependant, lors d'une administration orale de l'AINS, un effet irritant local, dépendant des propriétés physicochimiques de la molécule (caractère acide notamment) s'y ajouterait, conduisant à une rupture de la barrière muqueuse par plusieurs mécanismes : séquestration ionique responsable d'une accumulation tissulaire, découplage de la phosphorylation oxydative, source d'un épuisement énergétique cellulaire, complexation avec les phospholipides amphiphiles du mucus diminuant l'effet de barrière protectrice *(5, 7, 8)*. Comme la production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe également à la réaction inflammatoire (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire, etc.), au processus algogène (sensibilisation des nocicepteurs périphériques, transmission spinale et supraspinale des influx) et à la fièvre (dérégulation du thermostat hypothalamique) *(9)*, on a cru, jusqu'à la découverte de 2 isoenzymes de la COX, en l'impossibilité de dissocier les effets thérapeutiques des AINS de certains de leurs effets indésirables.

DE LA DÉCOUVERTE DE DEUX ISOENZYMES DE LA COX AU DÉVELOPPEMENT D'AINS SÉLECTIFS DE COX-2

La recherche sur les AINS a bénéficié d'un nouvel élan dans les années 1990, après la découverte d'une activité COX associée aux phénomènes de prolifération cellulaire, pouvant être stimulée par les médiateurs pro-inflammatoires, comme les endotoxines bactériennes, et supprimée par les glucocorticoïdes *(10)*. La principale conséquence de cette découverte fut de démontrer que l'activité COX, que l'on attribuait jusqu'alors à une enzyme unique dans l'organisme, recouvrait en fait deux enzymes possédant des régulations bien distinctes.

* Laboratoire de pharmacologie et UMR CNRS-UHP 7561, faculté de médecine de Nancy, 54505 Vandœuvre.

Très rapidement, un nouveau gène fut cloné et il fut dénommé **COX-2**, le terme **COX-1** étant, dès lors, réservé à la COX exprimée constitutionnellement dans tous les tissus. Dans les dix années qui ont suivi, de nombreux travaux ont permis de préciser que :

– COX-2 est peu exprimée naturellement dans l'organisme, à l'exception de certaines régions du cerveau et du rein notamment ;

– COX-2 apparaît dans tous les tissus et tous les types cellulaires sauf les thrombocytes, sous l'action de médiateurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires par exemple), d'hormones ou de facteurs de croissance *(9)*.

Cela a conduit à un **nouveau concept** basé sur l'existence d'une **dichotomie** entre une COX-1 constitutionnelle, ayant un rôle physiologique majeur (gastroprotection, régulation de l'hémostase et de l'hémodynamique rénale, etc.) et une COX-2 inductible, ayant un rôle physiopathologique essentiel (mitogenèse, inflammation, reproduction) *(figure 1)*. L'opposition entre la "bonne" COX-1 et la "mauvaise" COX-2 est trop manichéenne pour être parfaitement exacte, d'autant que la participation de COX-2 dans certaines régulations physiologiques, comme l'équilibre hydro-électrolytique *(11)*, et celle de COX-1 dans quelques processus pathologiques, y compris l'inflammation et/ou l'hyperalgie *(12)*, ont été suggérées. Cependant, il est désormais bien établi que COX-2 est majoritairement responsable de la production exagérée de prostaglandines en situation inflammatoire et que COX-1 supporte l'essentiel de la production basale de prostaglandines gastroprotectrices *(3, 10)*. Par conséquent, la plupart des propriétés thérapeutiques des AINS, à l'exception de leur effet antithrombotique potentiel, semblent liées à l'inhibition de COX-2 et certains de leurs effets indésirables (digestifs notamment) paraissent imputables à l'inhibition de COX-1.

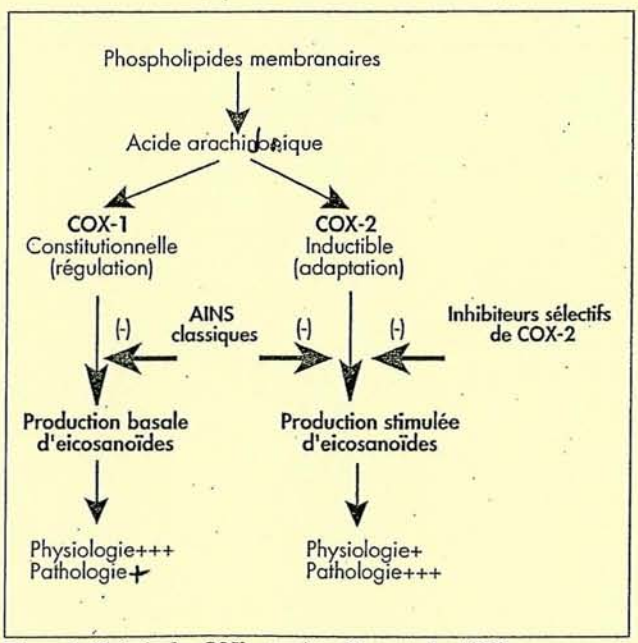


Figure 1. Théorie des COXs et points d'impact des AINS.

Cette **théorie des COXs** a généré un effort intensif de la part de l'industrie pharmaceutique, pour trouver des molécules susceptibles d'inhiber COX-2, sans inhiber COX-1. Ces recherches ont conduit à la commercialisation du premier inhibiteur sélectif de COX-2 (agrément du célécoxib par la FDA [*Food and Drug Administration*] le 31/12/98), environ 10 ans après la découverte de cette enzyme, ce qui, compte tenu des contraintes inhérentes au développement des médicaments, constitue un délai extrêmement court. Ces travaux ont également fourni des bases explicatives fondamentales à l'inhibition distincte de COX-1 et COX-2 :

– les études cristallographiques aux rayons X (1re cristallisation de COX-1 ovine en 1994 et de COX-2 humaine en 1996) ont révélé l'existence de différences structurales subtiles entre ces enzymes *(13)* : canal hydrophobe contenant le site actif COX plus large dans COX-2 que dans COX-1 ; existence d'une poche latérale supplémentaire dans le site actif de COX-2 ; différences entre quelques acides aminés jouant un rôle discriminant dans l'encombrement stérique du site actif ;

– l'analyse des cinétiques d'inhibition des COXs par les AINS a confirmé la singularité du mécanisme d'action de l'aspirine (seul AINS bloquant irréversiblement les activités COXs) et a révélé la possibilité d'inhiber COX-2 plus durablement (inhibition d'interaction lente ou lentement réversible) que COX-1 (inhibition compétitive simple ou rapidement réversible) *(14)*.

Parallèlement, de nombreuses méthodes biologiques (enzymes purifiées, lignées cellulaires, etc.) ont été développées pour le criblage des médicaments, sur le principe de la comparaison du pouvoir inhibiteur des molécules sur des systèmes simplifiés exprimant majoritairement et/ou exclusivement COX-1 ou COX-2 *(15)*. L'ensemble de ces travaux a permis de définir la notion de **sélectivité** des AINS, exprimée initialement sous la forme du rapport des valeurs de CI_{50} (concentration inhibant l'activité enzymatique de 50 %) vis-à-vis de COX-2 et de COX-1 (sélectivité pour COX-2 traduite par un rapport élevé si indice $C_{150COX\text{-}1}/C_{150COX\text{-}2}$ ou un rapport faible si indice $C_{150COX\text{-}2}/C_{150COX\text{-}1}$). La première conséquence a été l'établissement d'une nouvelle classification des AINS, selon leur sélectivité d'inhibition des isoenzymes de la COX, et non selon leur structure chimique *(16)*. La prise en considération du pouvoir inhibiteur des molécules sur les tissus cibles (articulation inflammatoire, muqueuse gastrique, etc.) dans les modèles animaux *(17)*, et du niveau d'inhibition des isoenzymes sanguines (COX-1 plaquettaire, COX-2 leucocytaire), après prise orale du médicament chez l'homme *(18)*, est venue compléter la définition de la **sélectivité des AINS pour les COXs** *(19)*. Sur la base de ces critères de sélectivité, on distingue désormais 3 catégories d'AINS :

– ***les inhibiteurs non sélectifs des COXs*** (la majorité des AINS classiques) qui inhibent à la fois COX-1 et COX-2 aux posologies recommandées, à l'exception des posologies antithrombotiques d'aspirine (inhibition sélective ou préférentielle de COX-1 selon la posologie) ;

– *les inhibiteurs préférentiels de COX-2* (comme le méloxicam Mobic® et le nimésulide Nexen®) dont la sélectivité d'inhibition sur COX-2 n'apparaît qu'aux posologies minimales recommandées ;
– *les inhibiteurs sélectifs de COX-2* (comme le célécoxib Celebrex® et le rofécoxib Vioxx®), parfois dénommés "inhibiteurs spécifiques de COX-2" ou "anti-COX-2" par abus de langage ou anglicisme, qui n'inhibent pas significativement COX-1 aux posologies maximales recommandées.

Il est important de souligner l'intérêt des études cliniques, qui seules, permettent d'établir la sélectivité aux posologies répondant à des critères d'efficacité et en tenant compte des propriétés pharmacocinétiques des produits *(19)*. Toutefois, on ne dispose actuellement que d'une sélectivité clinique vis-à-vis des COXs sanguines, ce qui est pertinent par rapport aux enzymes tissulaires (pouvoir inhibiteur comparable d'un AINS sur la COX-1 plaquettaire et sur une biopsie gastrique *[20]*), mais ne rend pas compte des différences de concentrations pouvant exister entre les compartiments, central (circulation sanguine) et périphériques (muqueuse gastrique par exemple).

PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES NOUVEAUX AINS INHIBITEURS SÉLECTIFS DE COX-2

Ces nouveaux AINS constituent la sous-classe des coxibs, selon la nomenclature de l'OMS qui propose les segments-clefs devant être utilisés dans la dénomination commune internationale (DCI) des médicaments. Ils possèdent des structures chimiques qui les distinguent nettement de celles des AINS classiques, notamment par la présence de plusieurs cycles aromatiques s'organisant en une volumineuse structure tricyclique, par l'absence de fonction acide carboxylique ou énolique et par la présence de groupements sulfonamide (célécoxib, Laboratoires Searle-Pharmacia) ou méthylsulfone (rofécoxib, Laboratoires Merck) *(figure 2)*. Ces caractéristiques structurales jouent un rôle discriminant essentiel dans la sélectivité des molécules puisqu'elles leur permettent de pénétrer dans le site actif (canal hydrophobe large) de COX-2 sans pouvoir pénétrer dans le site actif (canal hydrophobe étroit) de COX-1. De plus, l'encombrement stérique provoqué par ces molécules et l'absence de fonction acide carboxylique, responsable du positionnement des AINS classiques dans le site catalytique de COX-2, favorisent un changement de conformation (déformation) de l'enzyme et conduisent à une inhibition durable de COX-2. En corollaire, aucun des AINS classiques ne possède les pré-requis structuraux pour assurer une inhibition sélective de COX-2, même si tous les inhibiteurs sélectifs brevetés par l'industrie pharmaceutique n'ont pas nécessairement une structure proche de celle des coxibs commercialisés *(21)*. Les caractéristiques structurales des coxibs ont également des conséquences pharmacologiques directes puisque, si l'absence de fonction acide supprime théoriquement certaines potentialités irritantes locales vis-à-vis de la muqueuse digestive (voir 1er paragraphe), elle réduit considérablement l'hydrosolubilité des molécules. Ces propriétés physicochimiques

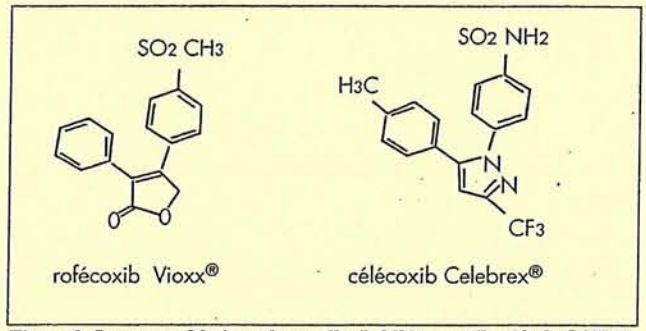


Figure 2. Structure chimique des coxibs (inhibiteurs sélectifs de COX-2).

concourent donc à la meilleure tolérance digestive des nouveaux AINS administrés par voie orale, mais nécessitent de développer des pro-médicaments comme le parécoxib, qui est la prodrogue d'un autre inhibiteur sélectif en développement, le valdécoxib (Laboratoires Searle) *(22)*, pour obtenir des formes pharmaceutiques injectables. D'autre part, l'absence de fonction acide des coxibs leur supprime la capacité de se fixer avec une forte affinité sur certains sites particuliers de la molécule d'albumine *(23)*, forme majoritaire de transport des AINS dans l'organisme, ce qui réduit les risques d'interactions médicamenteuses avec des médicaments acides, comme les anticoagulants oraux ou les sulfamides hypoglycémiants, qui sont défixés de leur protéine de transport par les AINS classiques. Enfin, la présence d'une fonction sulfonamide pose la question d'une éventuelle réactivité croisée chez les patients ayant des antécédents d'allergie aux sulfamides.

Chez l'homme, la biodisponibilité du célécoxib et du rofécoxib après administration orale serait respectivement de 65 et 93 %. Le temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale (Tmax) est, en moyenne, de 2 à 4 heures pour le célécoxib et de 2 à 3 heures pour le rofécoxib, avec cependant une grande variabilité interindividuelle pour cette molécule. Leur absorption est faiblement diminuée par la présence d'anti-acides (réduction d'environ 10 % de l'aire sous la courbe [ASC] des concentrations plasmatiques en fonction du temps) et est légèrement retardée (décalage du Tmax de 1 à 2 heures), mais elle est parfois favorisée (augmentation de 10 à 20 % de l'ASC du célécoxib) par un repas riche en graisses. Les coxibs sont fortement fixés aux protéines plasmatiques (97 % pour le célécoxib, 87 % pour le rofécoxib), y compris à l'albumine (mais avec une faible affinité), mais ils ont un volume de distribution apparent élevé (300 à 600 l pour le célécoxib, environ 90 l pour le rofécoxib) par rapport aux AINS classiques, ce qui pourrait refléter leur plus grande liposolubilité. Le franchissement des barrières fœtoplacentaire et hémato-encéphalique et le passage dans le lait ne sont documentés que chez l'animal. Les coxibs sont majoritairement métabolisés dans le foie (seulement 1 à 2 % éliminés sous forme inchangée dans les urines et 3 % [célécoxib] à 14 % [rofécoxib] dans les selles) par des réactions d'oxydation, d'hydroxylation, de réduction et de glucuronoconjugaison conduisant à des métabolites inactifs. Le CYP2C9, enzyme

pour laquelle il existe un polymorphisme génétique, est principalement responsable de la métabolisation du célécoxib, alors que la contribution des cytochromes P450 est actuellement peu documentée pour le rofécoxib. Il faut cependant noter que les variations du métabolisme hépatique seront la principale source d'interaction médicamenteuse avec les coxibs. Ainsi, l'administration concomitante d'inducteurs enzymatiques comme la rifampicine (célécoxib, rofécoxib), le phénobarbital ou la carbamazépine (célécoxib), diminue significativement les concentrations plasmatiques de coxibs. De même, l'administration concomitante de fluconazole, inhibiteur puissant du CYP2C9, augmente significativement les concentrations plasmatiques de célécoxib, alors qu'aucune modification des paramètres pharmacocinétiques des coxibs n'est observée en présence de kétoconazole, un inhibiteur puissant du CYP3A4. À l'opposé, les coxibs ont des potentialités inhibitrices sur le CYP2D6 (célécoxib) et le CYP1A2 (rofécoxib) et sont susceptibles d'augmenter les concentrations plasmatiques de médicaments qui sont leurs substrats (warfarine, tacrine, théophylline par exemple pour le rofécoxib, antidépresseurs tricycliques et sérotoninergiques, neuroleptiques, pour le célécoxib). La demi-vie d'élimination est de 8 à 12 heures pour le célécoxib et d'environ 17 heures pour le rofécoxib, bien que cette dernière puisse varier de 9 à 21 heures selon la posologie administrée *(24, 25)*.

Les coxibs sont autorisés dans de nombreux pays, avec un succès commercial évident aux États-Unis *(26)*, et sont désormais disponibles en France (depuis le 21/04/2000 pour le rofécoxib, avant la fin de l'année pour le célécoxib). Il est important de souligner que, suite aux décisions de la FDA (*Food and Drug Administration*), le célécoxib et le rofécoxib ont des indications différentes aux États-Unis :

- ***célécoxib*** : traitement symptomatique de la polyarthrite rhumatoïde (PR) chez l'adulte et de l'arthrose (OA) (posologies recommandées = 200 à 400 mg/jour en 2 prises pour la PR ; 200 mg/jour en 1 ou 2 prises pour l'OA).
- ***rofécoxib*** : traitement de la douleur aiguë chez l'adulte, dysménorrhées primaires, traitement symptomatique de l'arthrose (posologies recommandées = 12,5 à 25 mg/jour en 1 prise dans l'arthrose, prise initiale de 50 mg/j dans le traitement de la douleur).

En France, les indications du célécoxib seront identiques à celles des États-Unis alors que le rofécoxib n'est actuellement indiqué que dans le traitement symptomatique de l'arthrose. Les essais cliniques ont montré que le célécoxib et le rofécoxib sont, aux posologies préconisées et dans les indications retenues, significativement plus actifs que le placebo et aussi actifs que les AINS non sélectifs de référence (naproxène, ibuprofène, diclofénac, nabumétone selon les cas) *(25, 27-29)*. Les essais ont cependant été réalisés essentiellement chez les patients arthrosiques ou polyarthritiques, alors que les données demeurent peu nombreuses dans les autres modèles de douleurs (douleurs dentaires ou postopératoires par exemple), notamment en ce qui concerne la comparaison avec le paracétamol *(25, 30)*. En outre, l'incidence des ulcérations gastro-intestinales (évaluation endoscopique et/ou importance des pertes fécales de sang) au cours des études cliniques à court terme (12 ou 24 semaines) est équivalente à celle observée avec le placebo et significativement plus faible que celle observée avec des AINS non sélectifs. De plus, les premiers résultats de la surveillance postmarketing du célécoxib aux États-Unis montrent que, après 6 mois de commercialisation, la fréquence des effets indésirables graves, et notamment celle des décès imputables à des incidents digestifs, est environ 3 fois plus faible que ce qui est généralement observé chez des patients prenant régulièrement un AINS classique *(31)*. On peut cependant souligner que la réduction de l'incidence des complications gastro-intestinales majeures pourrait être plus modeste pour une durée de traitement de un an par le rofécoxib *(32)*. D'autre part, bien que non négligeable, l'incidence cumulée des troubles dyspeptiques cliniques observée avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2 est inférieure à celle des AINS comparateurs. Ironie du sort, un débat existe actuellement pour déterminer si une différence de sélectivité d'inhibition de COX-2, entre le rofécoxib et le célécoxib, pourrait expliquer un profil différent d'effets indésirables digestifs entre ces molécules.

CONCLUSION

L'amélioration de la tolérance digestive semble l'avancée thérapeutique la plus marquante de cette nouvelle génération d'AINS. Elle permettra peut être d'élargir le domaine d'utilisation des AINS classiques, sous réserve que d'autres effets indésirables (rénaux, cardiovasculaires) ne viennent pas limiter leur presciption prolongée. En ce sens, l'extension d'indication du célécoxib aux États-Unis (décembre 1999), dans la prise en charge de la polypose familiale (800 mg en 2 prises quotidiennes *[33]*), peut être considérée comme l'opportunité de bénéficier des propriétés chimiopréventives des AINS *(34)*, dont l'utilisation dans le cancer rectocolique était jusqu'alors limitée par le risque d'effet indésirable digestif grave. Des études évaluent actuellement l'intérêt des AINS sélectifs de COX-2 comme complément de la chimiothérapie anticancéreuse *(30)*, bien que l'effet chimiopréventif des AINS ne semble pas pouvoir être étendu à l'ensemble des cancers *(35)*. Des essais cliniques sont également en cours dans la prévention et le ralentissement de la progression de la maladie d'Alzheimer *(30)*. Cette utilisation est justifiée, à la fois par des études épidémiologiques, suggérant que les AINS préviendraient ou ralentiraient la progression des symptômes, mais aussi par les nombreuses manifestations inflammatoires associées à l'activation des astrocytes et de la microglie au cours de la maladie *(36)*. Il faut cependant rappeler que les AINS inhibant sélectivement COX-2 ont des effets indésirables qui peuvent relever des particularités structurales des inhibiteurs (réactions allergiques par exemple) ou de l'inhibition de COX-2 elle même (effets indésirables rénaux par exemple), et que l'ensemble de ces effets ne sera pas corrigé par une absence d'inhibition de COX-1. Ainsi, la confirmation du rôle de COX-2 dans le maintien de l'homéostasie rénale, chez les patients en situation d'hyperfusion, pose le problème de la

tolérance des inhibiteurs sélectifs au long cours (rétention hydrosodée et potassique, réduction de la filtration glomérulaire ?) et notamment lorsqu'il existe une hypertension artérielle. D'ailleurs, des études sont en cours pour comparer les effets tensionnels du célécoxib et du rofécoxib chez les patients arthrosiques hypertendus *(37)*. Les nouveaux AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2 font donc actuellement l'objet des précautions d'emploi usuelles des AINS et partagent la plupart de leurs contre-indications. Leur apport thérapeutique réel (indice bénéfice/risque) sera mieux défini lorsque des essais cliniques ciblés sur l'étude de certains effets indésirables auront été réalisés (risques thrombo-emboliques notamment) et que les systèmes de pharmacovigilance auront, avec un recul plus conséquent, recueilli des données incluant des patients potentiellement à risque (sujets âgés traités au long cours par exemple).

Remerciements : Les auteurs remercient Monsieur Bernard Terlain pour ses conseils lors de la rédaction de cet article.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. *Lichtenstein DR, Syngal S, Wolfe MM. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract : the double-edged sword. Arthritis Rheum 1995 ; 1 : 5-18.*
2. *Bertin P. Inhibiteurs spécifiques de la COX-2 : une révolution dans les anti-inflammatoires ? Revue du Praticien 2000 ; 14 (484) : 69-72.*
3. *Pairet M, Netter P, Jouzeau JY, et al. Inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2) : intérêts et limites. Thérapie 1999 ; 54 : 433-45.*
4. *Bagheri H, Lhiaubet V, Montastruc JL et al. Photosensitivity to ketoprofen. Mechanisms and pharmacoepidemiological data. Drug Safety 2000 ; 22 : 339-49.*
5. *Scarpignato C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs : how do they damage gastroduodenal mucosa ? Dig Dis 1995 ; 13 (suppl 1) : 9-39.*
6. *Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. Nature 1971 ; 231 : 232-5.*
7. *Schœn RT, Vender RJ. Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. Am J Med 1989 ; 86 : 449-58.*
8. *Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy : the second hundred years. Gastroenterology 1997 ; 112 : 1000-16.*
9. *Dubois RN, Abramson SB, Crofford L et al. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J 1998 ; 12 : 1063-73.*
10. *Vane JR. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med 1998 ; 104 (3A) : 2S-8S.*
11. *Kömhoff M, Gröne HJ, Klein T et al. Localization of cyclooxygenase-1 and –2 in adult and fetal human kidney : implication for renal function. Am J Physiol 1997 ; 272 : F460-8.*
12. *Wallace JL, Bak A, McKnight W et al. Cyclooxygenase-1 contributes to inflammatory responses in rats and mice : implication for GI toxicity. Gastroenterology 1998 ; 115 : 101-9.*
13. *Garavito RM, DeWitt DL. The cyclooxygenase isoforms : structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. Biochim Biophys Acta 1999 ; 1441 : 278-87.*
14. *Gierse JL, Koboldt CM, Walker MC et al. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. Biochem J 1999 ; 339 : 607-14.*
15. *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 : S17-25.*
16. *Frölich JC. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. Trends Pharmacol Sci 1997 ; 18 : 30-4.*
17. *Futaki N, Yoshikawa K, Hamasaka Y et al. NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. Gen Pharmacol 1993 ; 24 : 105-10.*
18. *Panara MR, Padovano R, Sciulli MG et al. Effects of nimesulide on constitutive and inducible prostanoid biosynthesis in man. Clin Pharmacol Ther 1998 ; 63 : 672-81.*
19. *Lipsky PE, Abramson SB, Crofford L et al. The classification of cyclooxygenase inhibitors. J Rheumatol 1998 ; 25 : 2298-303.*
20. *Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med 1998 ; 104 : 413-21.*
21. *DeLeval X, Delarge J, Somers F et al. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. Curr Med Chem 2000 ; 7 : 1041-62.*
22. *Talley JJ, Bertenshaw SR, Brown DL et al. 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 2000 ; 43 : 1661-3.*
23. *Lapicque F, Muller N, Payan E et al. Protein binding and stereoselectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Clin Pharmacokinet 1993 ; 25 : 115-23.*
24. *Davies NM, McLachlan AJ, Day RO et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib : a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. Clin Pharmacokinet 2000 ; 38 : 225-42.*
25. *Cannon GW. Rofecoxib : a specific cyclooxygenase inhibitor. Drugs Today 2000 ; 36 : 255-62.*
26. *COX-2 Inhibitors : Up and Coming Drugs and Potential New Applications. Drug & Market Development, 1999 ; 10 : 337-45.*
27. *Simon LS, Lanza FL, Lipsky PE et al. Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor. Arthritis Rheum 1998 ; 41 : 1591-602.*
28. *Simon LS, Weaver AL, Graham DY et al. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis : a randomized controlled trial. JAMA 1999 ; 282 : 1961-3.*
29. *Hawkey CJ, Laine L, Simon T et al. Comparison of the effect of rofecoxib (a cyclooxygenase 2 inhibitor), ibuprofen, and placebo on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis : a randomized double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 2000 ; 43 : 370-7.*
30. *Celecoxib Celebra®, Celebrex®. Drugs Fut 2000 ; 25 : 741-6.*
31. *Singh G, Ramey DR, Triadafilopoulos G. Experience with selective COX-2 inhibitors : safety profile in over 780 000 patients year of use. Arthritis Rheum 1999 ; 42 (suppl.9) : 1352 (Abstract).*
32. *Langman M, Jensen DM, Watson D et al. Adverse upper gastrointestinal effects of rofecoxib compared with NSAIDs. JAMA, 1999 ; 282 : 1929-33.*
33. *Steinbach G, Lynch PM, Phillips RKS et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 2000 ; 342 : 1946-52.*
34. *Smalley WE, Dubois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Adv Pharmacol 1997 ; 39 : 1-20.*
35. *Langman MJS, Cheng KK, Gilman EA et al. Effect of anti-inflammatory drugs on overall risk of common cancer : case-control study in general practice research database. BMJ 2000 ; 320 : 1642-6.*
36. *Blain H, Jouzeau JY, Blain A et al. Anti-inflammatoires non stéroïdiens sélectifs de la cyclooxygénase-2 pour la maladie d'Alzheimer : Justification et perspectives. Presse Méd 2000 ; 29 : 267-73.*
37. *Innes C. Contest between the COX-2 inhibitors continues. Reactions 2000 ; 815 : 3-4.*

© Masson, Paris, 2004.

Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase

Jean-Yves JOUZEAU (1, 2), Mikaël DAOUPHARS (1), Alexandre BENANI (1), Patrick NETTER (1, 2)

(1) Laboratoire de Pharmacologie et UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine de Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy ;
(2) Service de Pharmacologie Clinique et Toxicologie, Hôpital central, CHU de Nancy, Nancy.

RÉSUMÉ

La découverte d'au moins deux iso-enzymes de la cyclooxygénase (COX) a eu deux conséquences majeures : *i)* la stimulation des recherches sur le métabolisme des lipides ayant conduit à la cristallisation de ces enzymes membranaires particulières, la caractérisation de leurs sites actifs et de leur régulation génique, et à l'identification de nouvelles voies de biotransformation ; *ii)* le développement de nouveaux AINS susceptibles d'avoir un index bénéfice/risque amélioré, les coxibs. Ces molécules se définissent par leur sélectivité d'inhibition de COX-2, c'est-à-dire par leur pouvoir inhibiteur négligeable sur la COX-1 plaquettaire *in vitro* et *ex vivo* après prise orale des posologies maximales recommandées. Les coxibs commercialisés en France (célécoxib, rofécoxib, parécoxib) ne sont cependant pas équivalents en termes de sélectivité et certaines molécules de "deuxième génération" (étoricoxib, lumiracoxib) seront encore plus sélectives de COX-2. Ces "nouveaux" coxibs correspondent au développement ultime de la notion de sélectivité pour COX-2 et permettront probablement d'appréhender les limites du concept thérapeutique basé sur l'inhibition sélective de cette iso-enzyme.

SUMMARY

Pharmacology and dassification of cyclooxygenase inhibitors

Jean-Yves JOUZEAU, Mikaël DAOUPHARS, Alexandre BENANI, Patrick NETTER

(Gastroenterol Clin Biol 2004;28:C7-C17)

The discovery of at least two cyclooxygenase (COX) iso-enzymes had two major consequences : i) to give a new impetus to the research on lipid metabolism, giving rise to the crystallization of these peculiar membrane enzymes, the characterization of their active sites and their gene regulation, and the identification of new metabolic pathways; ii) the development of new NSAIDs aimed to have an improved safety profile, the coxibs. These drugs are defined by their COX-2 selectivity which is supported by a negligible inhibitory potency on platelet COX-1 in vitro and ex vivo after oral intake of maximal therapeutic doses. However, the coxibs marketed in France (celecoxib, rofecoxib, parecoxib) are not equivalent in terms of selectivity and some drugs developed by pharmaceutical companies (etoricoxib, lumiracoxib) will be even more selective for COX-2. These "new" coxibs are the final step in the theory of COX-2 selectivity and they will probably be helpful to better define the limitations of the therapeutic concept based on a selective inhibition of this iso-enzyme.

L'enjeu thérapeutique et économique des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) demeurent une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, que ce soit dans le cadre de la prescription médicale ou de celui de l'automédication, en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques ou antalgiques et même, pour 3 d'entre eux (aspirine, flurbiprofène et indobufène [non commercialisé en France]), inhibitrices de l'agrégation plaquettaire [1]. Cependant, la rançon de cette efficacité thérapeutique dépendante d'un mécanisme d'action supposé commun [2], l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines par la cyclooxygénase (COX), est qu'ils sont responsables d'une morbi-mortalité importante, générée principalement par leurs effets indésirables digestifs sévères [3] et rénaux [4]. La découverte d'au moins 2 iso-enzymes de la cyclooxygénase, dénommées COX-1 et COX-2, et la perspective de pouvoir distinguer les rôles physiopathologiques des médiateurs qu'elles produisent, a naturellement fait naître l'espoir de développer de nouveaux inhibiteurs de COX qui maintiendraient les propriétés thérapeutiques des AINS sans en conserver les effets indésirables [5]. Comme l'iso-enzyme COX-2 était celle qui était exprimée majoritairement en situation inflammatoire, le concept d'inhibiteur sélectif de la COX-2 (ISC) est né (voir figure 1) et a conduit rapidement à une nouvelle sous-classe d'AINS : les

Correspondance : J.-Y. JOUZEAU, Laboratoire de Pharmacologie et UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine de Nancy, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex. Tél : 03 83 68 39 50, Fax : 03 83 68 39 59, E-mail : jouzeau@medecine.uhp-nancy.fr
ou Service de Pharmacologie Clinique et Toxicologie, Hôpital central, CHU de Nancy, Avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, CO 134, 54035 Nancy Cedex. Tél. : 03 83 85 27 54, Fax : 03 83 85 13 84, E-mail : jy.jouzeau@chu-nancy.fr

ABRÉVIATIONS :
AINS: anti-inflammatoires non stéroïdiens.
COX : cyclooxygeénase.
ISC : inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase-2.
LO : lipoxygénase.
PGHS : prostaglandine H synthase.
PGG_2 : prostaglandine G_2.
PGH_2 : prostaglandine H_2.
PGI_2 : prostacycline.
$cPLA_2$: phospholipase A_2 cytosolique.
$sPLA_2$: phospholipase A_2 sécrétée.
PPARS : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes.
TxA_2 : thromboxane A_2.

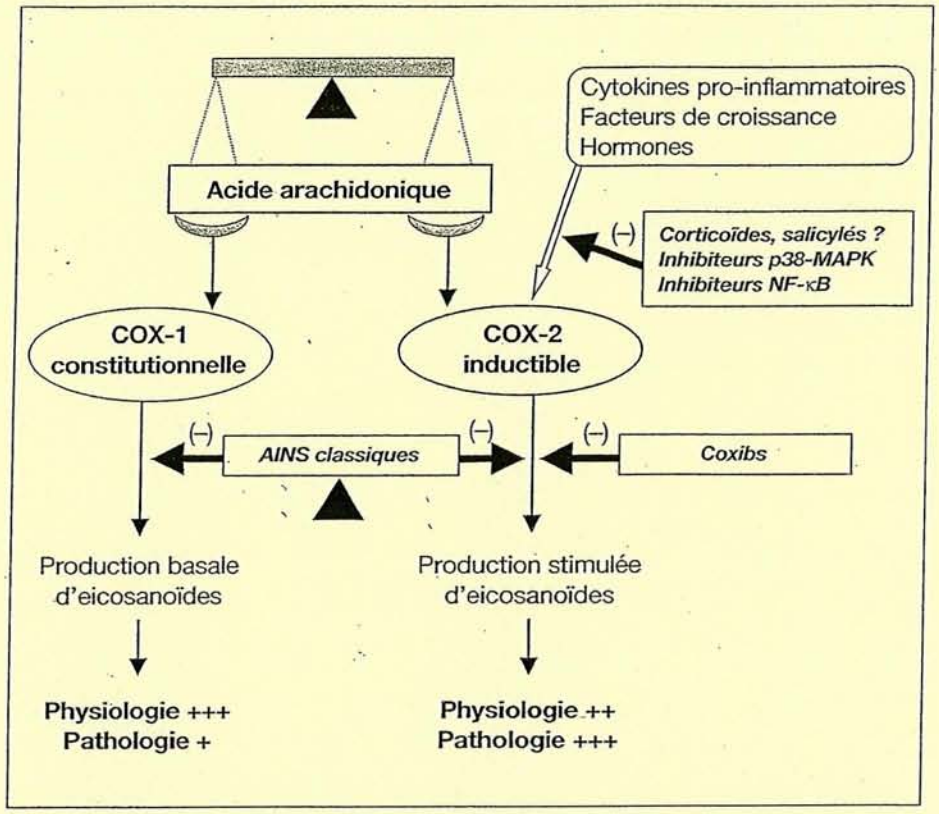


Fig. 1 – Modulation pharmacologique des iso-enzymes de la cyclooxygénase (COX).
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens ; NF-κB : "nuclear factor-κB" ; MAPK : "mitogen activated protein kinase".

Pharmacological modulation of cyclooxygenase (COX) isoenzymes.

coxibs. Après plusieurs années d'expérience thérapeutique avec ces molécules, et malgré leur succès commercial indéniable, la prescription médicale des ISC reste cependant entachée de nombreuses interrogations d'ordre pharmacologique (les ISC sont-ils tous équivalents ?), thérapeutique (doit-on réserver leur usage à certains patients ou au contraire les prescrire largement en première intention ?) ou économique (leur coût élevé par rapport aux AINS classiques est-il compensable par l'amélioration du service médical rendu ?).

Rappel sur le métabolisme de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique ou eicosa-5, 8, 11, 14-tétraénoïque, acide gras à 20 atomes de carbone (C20:4), est un constituant essentiel des membranes cellulaires issu de l'élongation et de la désaturation hépatique de l'acide linoléique [6]. Sa libération par hydrolyse enzymatique à partir des phospholipides membranaires constitue donc l'étape limitante de la biosynthèse des eicosanoïdes. Cette activité est principalement assurée par les phospholipases A_2, cytosoliques ($cPLA_2$, 85 kDa) ou secrétées ($sPLA_2$, 14 kDa), qui sont régulées de façon différente par la concentration en calcium ionisé et selon l'origine intra ($cPLA_2$) ou extracellulaire ($sPLA_2$) de cette variation [7]. Les stimulus capables d'activer ces phospholipases A_2, comme la bradykinine, certaines cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1, facteur de nécrose tumorale α) ou l'ionophore calcique A23187 sont donc naturellement des activateurs de la biosynthèse des eicosanoïdes.

L'acide arachidonique peut ensuite subir des biotransformations conduisant à de nombreux métabolites oxydés, les 4 voies principales étant celles des cyclooxygénases (COXs), des lipoxygénases (LOs), des cytochromes P-*450* et des isoprostanes. Certains composés sont d'ailleurs issus d'une métabolisation successive par plusieurs de ces systèmes enzymatiques.

Le système enzymatique qui assure les étapes initiales de biotransformation de l'acide arachidonique en prostanoïdes de la série 2 est une enzyme bi-fonctionnelle : la prostaglandine H synthase (PGHS). Cette enzyme assure, dans des sites actifs distincts, mais proches, une activité dioxygénasique responsable de l'oxydation de l'acide arachidonique en prostaglandine G2 (PGG2) et une activité peroxydasique responsable de la réduction de la PGG2 en prostaglandine H_2 (PGH_2) (voir figure 2 adaptée de [8]). C'est l'activité globale de biotransformation de l'acide arachidonique en endoperoxydes cycliques (PGG_2, PGH_2) que l'on dénomme PGHS ou COX, sachant que le terme COX ne devrait être utilisé *stricto sensu* que pour désigner l'activité dioxygénasique [9]. Cette synthèse a lieu généralement sur la face luminale du réticulum endoplasmique. Bien que les 2 activités enzymatiques soient distinctes, on soulignera que le taux de peroxyde est un régulateur de l'activité dioxygénasique, ce qui permet de comprendre que certaines molécules ayant des propriétés réductrices, comme le paracétamol, puissent moduler l'activité COX de façon dépendante du niveau des peroxydes cellulaires [10].

La conversion de la PGH_2 en prostanoïdes comme les prostaglandines primaires (PGD_2, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$), le thromboxane A_2 (TxA_2) ou la prostacycline (PGI_2) dépend d'isomérases et de synthases qui sont exprimées sélectivement dans certains tissus ou

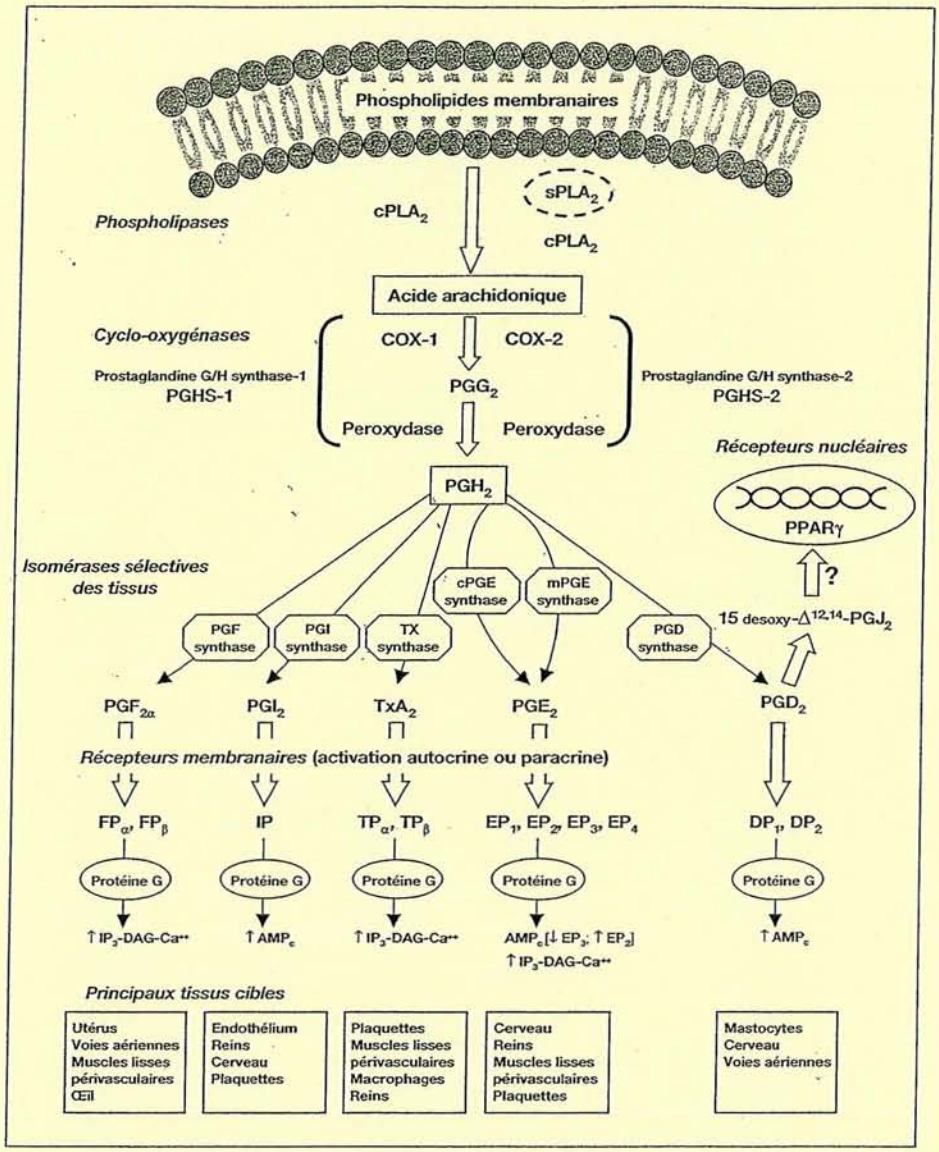


Fig. 2 – Voies de biosynthèse et actions des prostaglandines et du thromboxane (adaptée de [8]).
$cPLA_2$: phospholipase A_2 cytosolique ; $sPLA_2$: phospholipase A_2 sécrétée ; COX : cyclooxygénase ; PGHS : prostaglandine H synthase ; PG : prostaglandine ; TX : thromboxane ; cPGE : prostaglandine E synthase cytosolique ; mPGE : prostaglandine E synthase membranaire ; FP : récepteur de la prostaglandine F ; IP : récepteur de la prostacycline ; TP : récepteur du thromboxane ; EP : récepteur de la prostaglandine E ; DP : récepteur de la prostaglandine D ; PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes ; IP_3 : inositol triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique.

Biosynthesis and actions of prostaglandins and thromboxane (adapted from [8]).

certains types cellulaires (voir figure 2). Ces synthases sont situées à proximité de la PGHS sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique, ce qui permet une biotransformation rapide de la PGH_2 après qu'elle ait traversé la membrane par diffusion passive. À la différence de celle des endoperoxydes cycliques, il existe donc une "spécialisation tissulaire" de la biosynthèse des prostanoïdes [9]. Les exemples les plus démonstratifs sont la biosynthèse préférentielle de PGI_2 dans l'endothélium vasculaire, de TxA_2 dans les plaquettes, de PGE_2 dans le derme ou de $PGF_{2\alpha}$ dans les vésicules séminales. Ceci conditionne la nature des médiateurs choisis pour évaluer indirectement l'activité COX dans les études *in vitro* ou *in vivo*, 6-céto-$PGF_{1\alpha}$ comme témoin de la synthèse endothéliale de PGI_2 ou TxB_2 comme témoin de la biosynthèse de TxA_2 lors de l'activation plaquettaire par exemple. En corollaire, certains systèmes biologiques d'étude de l'activité COX sont peu pertinents si le type cellulaire choisi synthétise majoritairement un autre métabolite que celui qui est dosé, comme par exemple l'étude de la production de TxB_2 par les macrophages activés [11], alors que ceux-ci produisent principalement de la PGE_2. La nature des prostaglandines produites peut également varier au sein d'un même organe, comme cela a été démontré entre les différents segments du tube digestif [12], et est parfois sujette à des variations inter-espèces entre l'homme et les rongeurs. En dehors des cas particuliers des plaquettes *in vivo* et des lignées cellulaires *in vitro*, il faut également interpréter prudemment les concentrations de prostanoïdes vis-à-vis de leur dépendance aux iso-enzymes de la COX. Ainsi, après avoir longtemps pensé que la PGI_2 circulante était produite majoritairement par la COX-1 endothéliale, on a découvert récemment qu'elle dépendait de façon importante de l'activité COX-2 [13].

Les synthases biotransformant la PGH_2 sont également un élément essentiel de la régulation de la production des prostanoïdes, puisque certaines de leurs activités diminuent avec l'âge [14] ou, au contraire, sont augmentées par les médiateurs de la réaction inflammatoire [15]. Enfin, plus récemment, la voie de biotransformation de la PGD_2 en 15-desoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandine J_2 (15-d-PGJ_2) [16] a été à l'origine de nombreuses investigations, puisque ce métabolite participerait à la résolution de la réaction inflammatoire [17].

La biotransformation de l'acide arachidonique par certaines iso-enzymes de cytochromes P-*450*, encore appelée "voie des époxydes", conduit à des dérivés oxydés de l'acide eicosatriénoïque (EETEs, acides EpoxyEicosaTriEnoïques) [18] dont certains, comme le 5,6 EET, peuvent ensuite être métabolisés par les COXs et contribuer aux effets biologiques des prostaglandines [19]. À l'inverse, cette biotransformation dépendante des cytochromes P-*450* peut également concerner les métabolites de l'acide arachidonique produits sous l'action des COXs puisque, par exemple, les prostaglandines E sont métabolisées dans le liquide séminal en dérivés 19-hydroxylés par le cytochrome P-*450* 4F8 (CYP4F8) [20].

Enfin, l'oxydation de l'acide arachidonique ou de ses esters par les espèces réactives dérivées de l'oxygène génère des isoprostanes (stéréoisomères d'eicosanoïdes), dont certains, comme la 8-*iso*-$PGF_{2\alpha}$ (15-F_{2t}-IsoP) et la 8-*iso*-PGE_2 (15-E_{2t}-IsoP), partagent les propriétés vasorégulatrices des prostaglandines en interagissant avec leurs récepteurs TP et/ou EP [21]. Très récemment, les liens étroits qui existent entre ces médiateurs et les prostaglandines ont été renforcés puisque, d'une part, les isoprostanes se sont révélés être des activateurs des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) [22] et que, d'autre part, une synthèse de prostaglandines D_2 et E_2, indépendante de l'activité COX, a été rapportée à partir des 8-*iso*-PGD_2 (15-D_{2t}-IsoP) et 8-*iso*-PGE_2 (15-E_{2t}-IsoP) [23].

Des récepteurs aux effets des prostaglandines

Le rôle physiopathologique des prostaglandines a fait l'objet de nombreuses revues [24] dont il est impossible de reproduire ici l'exhaustivité. Plus récemment, une myriade de travaux de recherche, faisant notamment appel à l'utilisation d'animaux déficients [25], a tenté d'attribuer leurs fonctions à l'une ou l'autre des iso-enzymes de la COX [26]. On rappellera seulement que les prostanoïdes ont un rôle essentiel dans plusieurs grandes fonctions physiologiques comme la cytoprotection digestive, l'hémodynamique rénale et tout particulièrement le maintien de la pression de filtration glomérulaire en cas d'hypoperfusion, l'hémostase primaire et la régulation du tonus vasculaire, le maintien de l'ouverture du canal artériel chez le fœtus, l'ovulation, la nidation et la stimulation de la musculature utérine. Ces médiateurs sont également impliqués dans les processus de prolifération cellulaire et d'immunomodulation, notamment au niveau du tractus digestif [27], et contribuent directement à la genèse de la réaction inflammatoire (vasodilatation, œdème, tuméfaction) et des processus douloureux associés (abaissement du seuil de sensibilisation des terminaisons nerveuses aux substances algogènes) [28]. Ces effets sont médiés par la stimulation de récepteurs membranaires spécifiques de chaque prostanoïde [29], sur lesquels les médiateurs agissent de façon autocrine ou paracrine, sachant qu'il existe un recaptage cellulaire des prostaglandines [30]. Il existe au moins 5 types et 11 sous-types de récepteurs à 7 hélices α transmembranaires, qui sont couplés, *via* des protéines *Gs*, *Gi* ou *Gp*, à l'adénylate cyclase ou à la phospholipase C (voir figure 2). Les effets sur la signalisation intracellulaire sont parfois opposés entre les types de récepteurs (IP et EP_3 par exemple), voire entre leurs sous-types (EP_2 et EP_3 par exemple), ce qui permet d'expliquer, au moins en partie, certains antagonismes fonctionnels des prostaglandines vis-à-vis d'un même tissu ou la variabilité de la réponse observée selon les densités respectives en récepteurs exprimés. Les effets biologiques des prostaglandines relèvent probablement de processus encore plus complexes, puisqu'une proportion non négligeable des prostanoïdes (20 % pour PGE_2) est également retrouvée au niveau intracellulaire [31]. Si cela est cohérent avec l'existence de transporteurs susceptibles de contribuer à l'exportation cellulaire des prostaglandines autres que la PGH_2 [32], on ignore le rôle intracellulaire exact de ces médiateurs. D'autre part, certains métabolites des prostaglandines comme la 15-d-PGJ_2 seraient des ligands endogènes des récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) [33], ce qui leur conférerait la capacité de réguler directement l'expression de nombreux gènes impliqués dans le réaction inflammatoire [34] (voir figure 2).

Iso-enzymes de la cyclooxygénase

Bien que l'existence de plusieurs activités cyclooxygénasiques ait été soupçonnée depuis longtemps, en raison de la différence du pouvoir inhibiteur des AINS selon les tissus [35] et de l'influence variable des hydroperoxydes sur la catalyse enzymatique [36], l'existence d'au moins 2 iso-enzymes n'a été établie que dans les années 90. Il a fallu, dans un premier temps, que soit mise en évidence l'inhibition sélective d'une activité cyclooxygénasique induite par les cytokines pro-inflammatoires ou les endotoxines bactériennes par les glucocorticoïdes [37]. Dans un deuxième temps, il a fallu que les découvertes indépendantes d'une activité cydooxygénasique particulière dans les fibroblastes aviaires transformés par l'oncogène *v-src*, les cellules ovariennes de rat stimulées par les gonadolibérines ou les fibroblastes murins stimulés par les esters de phorbol, soient unifiées par le clonage d'un seul et même gène appelé COX-2 [38]. Le clonage des 2 iso-enzymes a été le point de départ de nombreuses expériences visant à étudier leur expression dans les différents tissus de l'organisme (à l'état basal ou pathologique) ainsi que leur régulation par les médiateurs de la réaction inflammatoire ou les facteurs de croissance. Les principales caractéristiques de ces gènes montrent que COX-2 est un gène précoce, pouvant faire l'objet d'une régulation transcriptionnelle (nombreux éléments de réponse à des facteurs de transcription activés par les cytokines) et post-transcriptionnelle (nombreuses séquences d'instabilité dans la région 5' non traduite de son ARNm), ce qui lui confère une grande inductibilité pour réaliser la synthèse stimulée de prostaglandines en situation de stress cellulaire [39]. Par contre, COX-1 a toutes les caractéristiques d'un gène domestique, notamment une très faible inductibilité et une grande stabilité de son ARNm, ce qui le prédispose à synthétiser des prostaglandines lors de l'homéostasie. S'il n'est pas surprenant en lui-même, puisque l'existence de cette nouvelle iso-enzyme a été suggérée pour expliquer les effets antalgiques du paracétamol [40], le clonage récent de COX-3 a révélé qu'il s'agit d'un variant de COX-1 issu d'un épissage alternatif de ce gène. Si son expression préférentielle dans le système nerveux central le prédispose à participer à la transmission des processus douloureux, le gène COX-3 se singularise surtout par sa séquence qui dérive de celle de COX-1 par la persistence de l'intron 1 [41].

D'un point de vue enzymatique, les 3 iso-enzymes possèdent des sites actifs de type dioxygénase et peroxydase capables d'assurer la biotransformation classique de l'acide arachido-

nique en PGH_2. Les protéines ont d'ailleurs une grande homologie de séquence, avec une conservation importante des acides aminés composant le site actif COX. Parmi les principales différences entre ces iso-enzymes on soulignera que : *i)* COX-2 a une sélectivité de substrat plus large que celle de COX-1, ce qui est cohérent avec la plus grande largeur de son site actif, mais lui permet également de synthétiser une plus grande variété de médiateurs lipidiques [42] ; *ii)* COX-2 est beaucoup plus sensible que COX-1 au tonus peroxydasique, de sorte qu'en présence d'un taux faible de peroxydes endogènes, l'acide arachidonique sera métabolisé préférentiellement par COX-2 plutôt que par COX-1 [43] ; *iii)* COX-1 et COX-2 diffèrent surtout par leurs extrêmités N et C-terminales, ce qui est mis à profit pour fabriquer des anticorps spécifiques contre chaque iso-enzyme ; *iv)* COX-3 a des propriétés catalytiques nettement inférieures à celles des 2 autres iso-enzymes, même si elle est la plus sensible au pouvoir inhibiteur du paracétamol [44] ; *v)* l'activité fonctionnelle de COX-1 est couplée à celles de la $cPLA_2$ en amont et de la cPGES en aval, alors que celle de COX-2 dépend également de la $sPLA_2$ en amont et uniquement de la mPGES en aval (voir figure 1), suggérant une biotransformation différente de l'acide arachidonique selon que la cellule fait appel à des enzymes constitutionnelles (homéostasie) ou inductibles (stimulation) [45]. En revanche, contrairement aux premières expériences de microscopie confocale ayant suggéré une localisation préférentielle de COX-2 dans la membrane nucléaire [46], on admet désormais que les 2 iso-enzymes ont une répartition uniforme dans les membranes cellulaires [47].

La structure tridimensionnelle des COXs, qui a été résolue récemment [48-50], a permis de montrer qu'il s'agit de protéines membranaires monotopiques (insérées dans un seul des 2 feuillets de la bicouche phospholipidique) présentes sous la forme d'homodimères glycosylés. Cette localisation permet le passage direct de l'acide arachidonique libéré à partir des membranes vers le site actif (voir figure 3 adaptée de [51]). Chaque monomère comprend trois domaines distincts : *i)* un petit domaine rappelant la structure de l'EGF ("Epidermal Growth Factor"), qui facilite la stabilisation du dimère ; *ii)* un motif hydrophobe de liaison à la membrane, qui permet l'insertion du dimère et le transit des acides gras membranaires ; *iii)* un domaine enzymatique globulaire comprenant un site dioxygénase et un site peroxydase (de type héminique) distincts. Les interactions spatiales entre le domaine enzymatique et le motif de liaison à la membrane délimitent un long canal hydrophobe dans lequel est métabolisé l'acide arachidonique (voir figure 2). La comparaison des 2 sites actifs des iso-enzymes de COX a confirmé le rôle commun essentiel de plusieurs acides aminés : *i)* Arg^{120} ou ^{106}, située à l'entrée du site actif et maintenue sous une forme protonée (NH_3^+) grâce à un pont salin avec un Glu^{524} ou ^{510}, qui est le site de fixation des dérivés carboxyliques (COO^-), qu'il s'agisse de l'acide arachidonique ou des AINS ; *ii)* Tyr^{355} ou ^{371}, située au sommet du site actif, qui est l'acide aminé catalytique nécessaire à l'insertion d'une première molécule d'oxygène sur l'acide arachidonique ; *iii)* Ser^{530} ou ^{516}, située au milieu du site actif, mais à proximité de l'acide aminé catalytique, qui est le site d'acétylation par l'aspirine (voir figure 2). Cette comparaison a également montré que : *i)* le site actif de COX-2 est plus large (+ 25 %) et plus volumineux (+ 17 %) que celui de COX-1, ce qui explique à la fois sa sélectivité de substrat moins restreinte et sa capacité de synthétiser de l'acide 15-*R*-hydroxy-eicosatétraénoïque (15-*R*-HETE) après acétylation par l'aspirine [52], alors que toute synthèse est bloquée dans COX-1 ; *ii)* le site actif de COX-2 possède une poche latérale supplémentaire par rapport à celui de COX-1, cette différence étant due à la substitution d'un acide aminé très volumineux de COX-1 ($Ileu^{523}$) par un acide aminé peu volumineux (Val^{509}) dans COX-2 ; *iii)* le site actif de COX-2 possède une voute apicale plus flexible que celle de COX-1 ; *iv)* COX-2 est plus flexible que COX-1, car elle peut exister sous plusieurs conformations (voir figure 2). Les co-cristallisations des iso-enzymes avec l'acide arachidonique, l'aspirine, le flurbiprofène ou le célécoxib ont démontré [53] que : *i)* les AINS classiques se fixent prioritairement sur l'Arg^{120} ou ^{106} selon l'iso-enzyme, de façon compétitive avec l'acide arachidonique ; *ii)* les coxibs se positionnent prioritairement dans le site actif de COX-2 *via* des interactions hydrophobes, mais pénètrent mal dans le site actif de COX-1 (voir figure 2). Ces études ont ainsi apporté des bases explicatives aux différences de pouvoir inhibiteur observées entre les AINS et les coxibs, tout en confirmant la possibilité de développer des inhibiteurs sélectifs de COX-2 par l'analyse des relations structure-activité de molécules tricycliques non acides.

Sélectivité des AINS vis-à-vis des iso-enzymes de la COX

La découverte de 2 iso-enzymes de la COX a tout naturellement conduit les chercheurs et les industriels pharmaceutiques à développer des systèmes biologiques permettant de comparer le pouvoir inhibiteur des AINS conventionnels sur chacune des iso-enzymes, mais surtout de cribler des molécules susceptibles d'inhiber sélectivement COX-2 [54]. À dessein d'avoir des activités enzymatiques distinctes pour COX-1 et COX-2, de très nombreux systèmes *in vitro* ont été proposés [5, 55]. Dans ces systèmes, le pouvoir inhibiteur d'un AINS est exprimé sous la forme de sa concentration inhibitrice 50 (CI_{50}, concentration à laquelle il diminue de 50 % l'activité enzymatique) et sa sélectivité par un indice correspondant au rapport des CI_{50} pour chaque iso-enzyme. Après des balbutiements concernant le sens dans lequel le rapport des CI_{50} devait être exprimé, on admet désormais que l'indice de sélectivité doit être exprimé sous la forme du rapport $CI_{50COX\text{-}1}/CI_{50COX\text{-}2}$ et que, par conséquent, un indice élevé atteste d'une sélectivité pour COX-2. Cependant, les indices de sélectivité ne doivent être considérés que comme des indicateurs pharmacologiques dont l'interprétation nécessite une connaissance critique des systèmes dans lesquels ils ont été déterminés. Ceci est d'autant plus important qu'une nouvelle classification des AINS, fondée sur leur sélectivité pour les COXs plutôt que sur leur structure chimique, a été proposée [56]. En effet, les sources de variabilité ont été très nombreuses en raison des caractéristiques de chaque système biologique et des conditions expérimentales choisies [5, 55]. Ainsi, les indices peuvent différer selon la nature (humaine ou animale) ou la pureté (homogénats cellulaires ou enzymes purifiées) des enzymes utilisées, selon la possibilité offerte aux AINS de franchir ou non les membranes cellulaires (cellules intactes ou lysées, microsomes), selon la pertinence physiologique des cellules utilisées (cellules résidentes, immortalisées ou transfectées), selon la durée de la pré-incubation entre l'AINS et le système enzymatique (de quelques minutes à plusieurs heures), selon la durée nécessaire à l'induction d'expression de COX-2 (immédiate à 24 heures), selon la source d'acide arachidonique utilisée (endogène ou exogène) et la concentration éventuellement ajoutée (de 2 à 100 µmoles/L), selon la possibilité offerte aux AINS de se fixer ou non aux protéines du milieu (absence, concentration faible ou physiologique de protéines). La conséquence immédiate est que les indices de sélectivité des molécules ne sont comparables que lorsqu'ils ont été déterminés dans le même système et les mêmes conditions expérimentales [57].

La deuxième conséquence a été de chercher le modèle cellulaire qui se rapprocherait le plus des conditions d'utilisation thérapeutiques des AINS et pourrait être considéré comme un

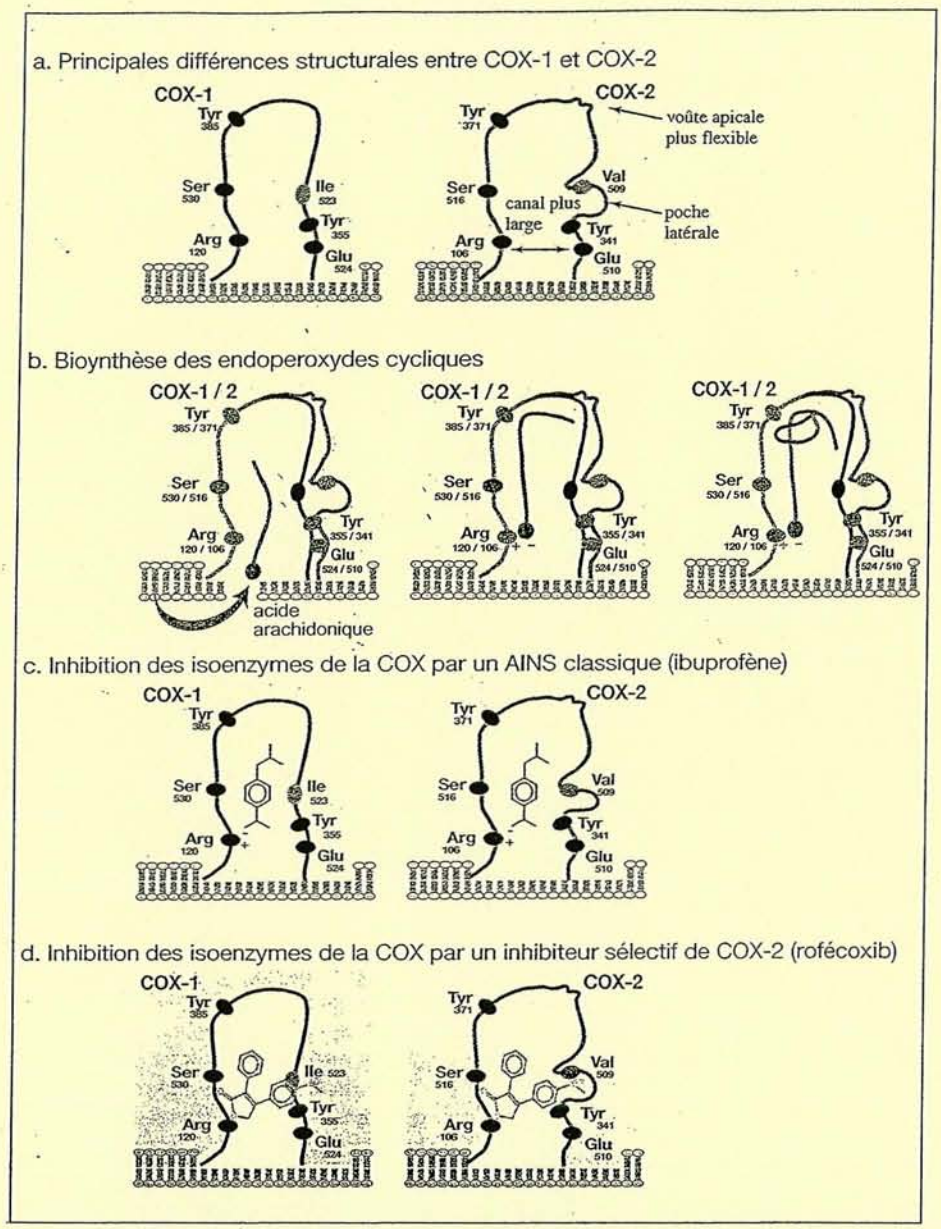


Fig. 3 – Comparaison des site actifs des iso-enzymes de la cyclooxygénase et de leur inhibition par les AINS conventionnels ou les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (adaptée de [51]).
a) structure comparée des sites actifs ; b) biotransformation de l'acide arachidonique ; c) inhibition des sites actifs par un AINS conventionnel (carboxylique) ; d) inhibition des sites actifs par un inhibiteur sélectif de COX-2 (coxib). Lire dans le texte pour plus de détails.

Comparison of cyclooxygenase isoenzymes active sites and their inhibition by classical NSAIDs or selective COX-2 inhibitors (adapted from [51]).

système de référence. Ce modèle est le système dit "sang total" utilisant les éléments figurés comme source d'enzymes [58]. Dans ce modèle, l'activité inhibitrice sur COX-1 est mesurée par la synthèse de thromboxane B_2, métabolite stable du thromboxane A_2, consécutive à l'activation plaquettaire par la thrombine lors de la coagulation spontanée (1 h à 37°C) et l'activité inhibitrice sur COX-2 par la synthèse de prostaglandine E_2 lors de l'activation monocytaire par une endotoxine bactérienne (10 µg/ml de LPS pendant 24 h à 37°C). Il est indéniable que ce système offre de nombreux avantages par rapport aux autres systèmes cellulaires en ce sens qu'il fait appel à des cellules cibles des AINS dans l'organisme, qu'il reproduit un taux physiologique de protéines autorisant la forte fixation protéique des AINS, qu'il prend en compte la capacité des AINS de pénétrer dans les cellules et qu'il permet de mesurer l'inhibition des 2 isoenzymes à partir d'un même prélèvement sanguin [59]. Une limite de ce système est cependant que le pouvoir inhibiteur sur COX-1 est mesuré après 1 h d'incubation, alors que celui sur COX-2 l'est seulement après 24 h, puisque c'est le temps nécessaire à l'expression optimale de la COX-2 leucocytaire en réponse au LPS. Ceci pourrait favoriser indirectement les indices de sélectivité des inhibiteurs sélectifs de COX-2 par rapport à ceux des AINS conventionnels, puisqu'ils inhibent COX-1 de façon rapidement réversible, mais COX-2 par un mécanisme lentement réversible (dit d'interaction lente) [60]. Une version modifiée de ce système a été proposée, dans laquelle le pouvoir inhibiteur sur COX-2 est étudié, en présence de sang total, vis-à-vis d'une lignée exprimant fortement cette iso-enzyme, mais la comparaison des AINS conventionnels avec les ISC n'en a pas été significativement modifée [61].

La plus grande qualité du système "sang total", est probablement qu'il permet également de mesurer le pouvoir inhibiteur sur les COXs *ex vivo*, après prise orale des AINS à posologie thérapeutique [59]. Ceci permet de prendre en considération la pharmacocinétique des molécules et notamment l'influence éventuelle de leurs métabolites sur l'inhibition des COXs, puisque certains AINS pourraient perdre leur sélectivité en étant rapidement transformés en dérivés inactifs [62]. Ceci permet également de comparer les indices de sélectivité obtenus *in vitro* et *ex vivo* chez l'homme, même si le calcul du pouvoir inhibiteur à partir des courbes dose-réponse obtenues *in vitro* et des concentrations circulantes d'AINS mesurées chez les patients n'est pas extrapolable pour tous les AINS [63]. Une sélectivité pour COX-2 se traduit alors par l'absence d'inhibition de l'activité COX-1 plaquettaire mesurée *ex vivo* par la biosynthèse du thromboxane B_2, confirmant que les ISC sont avant tout des molécules n'inhibant pas l'activité de COX-1 et non des molécules inhibant plus efficacement l'activité de COX-2 que les AINS classiques [64]. La synthèse du thromboxane est d'ailleurs un indicateur beaucoup plus sensible de l'effet inhibiteur des AINS que les tests d'agrégation plaquettaire, de sorte qu'une inhibition substantielle de ce paramètre biologique peut être observée sans répercussion sur les tests plaquettaires [65]. Il faut toutefois veiller à ne mesurer ce pouvoir inhibiteur que lorsque les concentrations circulantes d'AINS sont maximales, c'est-à-dire après prise répétée du médicament, puisqu'il existe un facteur d'accumulation de 1,5 à 2 pour les molécules à demi-vie longue [63]. Sur la base de la mesure de ce pouvoir inhibiteur après prise orale de posologies thérapeutiques des AINS, il est établi que les ISC n'inhibent pas significativement l'activité COX-1 plaquettaire aux plus fortes posologies recommandées, alors que les AINS conventionnels l'inhibent dès les plus faibles posologies efficaces [66]. Certaines molécules, comme le méloxicam et le nimésulide, qui n'inhibent significativement l'activité COX-1 plaquettaire qu'aux plus fortes posologies recommandées, sont parfois appelés inhibiteurs préférentiels de COX-2 [67]. Cette distinction provoque cependant une certaine confusion, qui est d'ailleurs entretenue par la littérature anglo-saxone dans laquelle "selective" peut dire préférentiel, puisque "specific" veut souvent dire sélectif. Bien qu'elle n'ait pas de caractère acide, ce qui la distingue nettement des AINS classiques et contribue probablement l'amélioration de sa tolérance digestive, la nabumétone (ou plus exactement son métabolite actif l'acide 6-méthoxy-2-naphtylacétique) n'est pas un inhibiteur sélectif de COX-2 [68].

Une autre démonstration clinique de cette sélectivité pour COX-2, beaucoup moins usitée pour des raisons éthiques évidentes, est de vérifier l'absence d'inhibition de l'activité COX-1 dans des biopsies gastriques. En effet, il a été démontré que le pouvoir inhibiteur des AINS sur des biopsies de muqueuse gastrique était proche de celui mesuré sur les plaquettes sanguines, confirmant que la COX-1 avait une sensibilité équivalente dans ces deux tissus [69]. Rappelons simplement que les concentrations locales d'AINS atteintes dans le tube digestif sont nettement supérieures à celles mesurées dans le sang, de sorte que la probabilité d'une absence d'inhibition de la COX-1 tissulaire n'a de pertinence que pour un indice de sélectivité élevé sur sang total. De plus, pour pertinente qu'elle soit, la mesure d'une inhibition gastrique des COXs représente un mélange de plusieurs types cellulaires et est probablement sujette à une variabilité selon le site de biopsie.

Enfin, en pharmacologie préclinique, la sélectivité d'inhibition des iso-enzymes de la COX est établie en utilisant des modèles classiques d'inflammation aiguë (œdème à la λ carragénine) ou chronique (polyarthrite par adjuvant), de douleur (test de Randall et Sellito) ou de fièvre (fièvre à la levure de bière) et des modèles de tolérance digestive comme la recherche d'ulcères gastroduodénaux ou de perte fécale d'hématies marquées au chrome 51 [70]. Dans ces conditions, la sélectivité pour COX-2 est évaluée soit par un indice de sélectivité, correspondant au rapport des doses efficaces 50 (DE_{50}, dose inhibant de 50 % l'activité) sur la synthèse de prostaglandines dans la muqueuse gastrique et les tissus inflammatoires, soit par un index de "sécurité", correspondant au rapport de la dose ulcérogène sur la dose efficace 50 pour l'un des paramètres d'efficacité. Dans les deux cas, une seléctivité pour COX-2 se traduit par un indice élevé. Néanmoins, l'index de "sécurité" a deux principales limites en tant qu'évaluateur de la sélectivité pour les iso-enzymes de COX : *i)* il varie selon le test d'efficacité que l'on choisit puisque, indépendamment de la molécule étudiée, la DE_{50} est toujours beaucoup plus faible dans la polyarthrite par adjuvant que dans l'œdème à la carragénine [71] ; *ii)* il n'est pertinent que si les effets mesurés dépendent exclusivement de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines, ce qui est loin d'être le cas pour le pouvoir ulcérogène [72] et l'effet anti-œdémateux [73].

Principales caractéristiques des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Les coxibs commercialisés en France se caractérisent chimiquement [74] par : *i)* l'absence de fonction acide carboxylique, ce qui leur confère un pouvoir irritant digestif réduit, mais est directement responsable de leur faible hydrosolubilité et de la difficulté de mettre au point des formes injectables de ces molécules ; *ii)* une structure volumineuse comprenant 2 grands cycles aromatiques reliés à un hétérocycle central, ce qui leur confère probablement une liposolubilité supérieure aux AINS classiques ; *iii)* la présence de groupements fonctionnels méthylsulfone pour le rofécoxib [75] ou sulfonamide pour le célécoxib [76] et le parécoxib [77], ce qui expose au risque de réaction allergique croisée avec ces 2 dernières molécules chez les patients ayant des antécédents d'allergie aux sulfamides (para-amino-sulfonamides). La plupart des coxibs en développement dans l'industrie pharmaceutique, ou en cours d'enregistrement auprès des autorités sanitaires, ont des structures proches de ces premières molécules, dont elles conservent la structure tricyclique et les groupements fonctionnels méthylsufone pour l'étoricoxib Arcoxia® [78] ou sulfonamide pour le valdécoxib Bextra® [79], et ne diffèrent principalement que par la nature de l'hétérocycle central : pyridinyl pour l'étoricoxib au lieu de furanone pour le rofécoxib, isoxazole pour le valdécoxib au lieu de pyrazole pour le célécoxib. Cependant, l'homogénéité structurale du groupe des coxibs n'est pas définitive puisque de nouvelles structures chimiques font leur apparition comme le lumiracoxib Prexige® [80], récemment commercialisé au Mexique, qui est une molécule proche du diclofénac ayant un squelette d'acide phénylacétique et dépourvu de groupements sulfonés (voir tableau I).

Même si peu d'études ont comparé les coxibs entre eux dans les mêmes conditions expérimentales [80, 81], les indices de sélectivité sur sang total dont on dispose montrent que le rofécoxib est plus sélectif de COX-2 que le célécoxib, ce que confirment les données d'inhibition de synthèse du thromboxane *ex vivo* : aucune inhibition à une posologie 20 à 40 fois supérieure à la posologie maximale recommandée pour le rofécoxib [75], inhibition significative à partir d'une posologie double de la posologie maximale recommandée pour le célécoxib [76]. Le valdécoxib et sa pro-drogue, le parécoxib, ont une sélectivité intermédiaire entre celles du rofécoxib et du célécoxib [81]. En revanche, l'étoricoxib est environ 3 à 4 fois plus sélectif de COX-2 que le rofécoxib, bien qu'il semble nettemment moins sélectif que le lumiracoxib [80]. Il est donc manifeste que les coxibs de

Tableau I. – Principales caractéristiques des inhibiteurs sélectifs de COX-2 (coxibs).
Main characteristics of the selective COX-2 inhibitors (coxibs).

Molécules	Rofécoxib [75]	Célécoxib [76]	Etoricoxib [78]	Valdécoxib [79]	Lumiracoxib [80]
Spécialités	Vioxx®	Célébrex®	Arcoxia®	Bextra®	Prexige®
Laboratoires	MSD-Chibret	Pharmacia	MSD-Chibret	Pharmacia	Novartis
AMM France	23/11/1999	24/5/2000	Absence	Absence[a]	Absence
Indications	OA - PR	OA - PR	OA - PR - goutte douleurs	OA - PR douleurs	OA - douleurs
Posologie quotidienne	12,5-25 mg (OA) 25 mg (PR)	200 mg (OA) 200-400 mg (PR)	60 mg (OA) - 90 mg (PR) 120 mg (douleurs	10 mg (OA, PR) 20-40 mg (douleurs)	400 mg
Structure chimique	Diaryl-furarone Méthylsulfone	Diaryl-pyrazole Sulfonamide	Pyridinyl-phényl-pyridine Méthylsulfone	Diaryl-isoxazole Sulfonamide	Phénylamino-benzyle Acide acétique
*F*voie orale	92-93 %	25-40 %	≈ 100 %	83 %	?
*T*max	2-3 h	2-3 h	1 h	2-3 h	2-3 h
Vd	86-91 L	300-600 L	120 L	86 L	?
Fixation protéique	87 %	97 %	92 %	98 %	?
Métabolisme	Hépatique réduction cytosol. + CYP-450 inhibiteur CYP-1A2	Hépatique CYP-2C9 (polymorphisme) inhibiteur CYP-2D6	Hépatique CYP-3A4 inhibiteur CYP-2C19	Hépatique CYP-3A4 + 2C9 inhibiteur CYP-2D6	Hépatique CYP-3A4 ?
*T*1/2	17 h (9-21)	11 h (8-12)	22 h	8 h (5-10)	3-6 h

[a] : *la prodrogue injectable du valdécoxib (parécoxib DYNASTAT®) a obtenu une AMM le 22/3/2002 dans l'indication "traitement à court terme des douleurs postopératoires" ; AMM : autorisation de mise sur le marché ; OA : arthrose ; PR : polyarthrite rhumatoïde ; Fvoie orale : biodisponibilité absolue par voie orale ; Tmax : temps nécessaire pour obtenir une concentration plasmatique maximale ; Vd : volume de distribution ; CYP : cytochrome P-450 ; T1/2 : demi-vie d'élimination.*

"deuxième génération" seront encore plus sélectifs de COX-2 que ne le sont les molécules actuellement disponibles en France, ce qui posera le problème de leur positionnement dans l'arsenal thérapeutique. Cependant, comme ces molécules poussent à l'extrême le concept de sélectivité pour COX-2, elles seront probablement susceptibles d'apporter des éclaircissements sur les effets indésirables cardio-vasculaires ou rénaux des ISC ou la fréquence non négligeable de leurs effets indésirables digestifs [82].

Hormis leur sélectivité vis-à-vis des iso-enzymes de la COX, les coxibs diffèrent également par leur pharmacologie clinique (voir tableau I). Ainsi, leur biodisponibilité par voie orale, peut varier de 25 à 40 % pour le célécoxib [76] à près de 100 % pour l'étoricoxib [78]. Leur volume apparent de distribution est de l'ordre d'une centaine de litres, ce qui est nettement supérieur à celui des AINS classiques et pourrait traduire leur plus grande liposolubilité. Le célécoxib doit être considéré à part, car son très grand volume de distribution (plusieurs centaines de L) est probablement la conséquence directe de sa médiocre biodisponibilité. Le temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale après prise orale des médicaments est généralement de l'ordre de 2 à 3 h, ce qui pourrait expliquer une certaine latence d'efficacité dans les modèles de douleurs aiguës. Ce paramètre peut être amélioré par l'administration parentérale des produits, comme dans le cas du parécoxib, ou par l'usage de l'étoricoxib lorsqu'il sera disponible. Certains coxibs ont cependant un effet antalgique prolongé par rapport aux AINS conventionnels [83]. La fixation aux protéines plasmatique est élevée pour toutes les molécules, même s'il convient de rappeler que l'absence de groupement acide carboxylique (à l'exception du lumiracoxib) diminue théoriquement le risque d'interaction médicamenteuse par défixation protéique. En revanche, leur biotransformation majoritairement hépatique constitue une source importante d'interactions médicamenteuses, d'autant que plusieurs coxibs se comportent expérimentalement comme des inhibiteurs de certaines isoformes de cytochrome P-*450* (CYP-*1A2*, CYP-*2D6* et CYP-*2C19*) impliquées dans la biotransformation de médicaments à index thérapeutique étroit [84]. D'autre part, il est important de mentionner que : *i)* les coxibs de deuxième génération dépendent majoritairement du CYP-*3A4* pour leur biotransformation et que ce cytochrome métabolise de très nombreux medicaments ayant une marge thérapeutique étroite, comme la ciclosporine ; *ii)* le CYP-*2C9*, qui métabolise le célécoxib, fait l'objet d'un polymorphisme génétique, peu fréquent chez les Caucasiens, mais qui concerne également de façon stéréosélective la biotransformation de la warfarine. Ceci permet de comprendre que l'instauration d'un traitement par célécoxib puisse augmenter l'INR (indice normalisé international) chez des patients traités par un anti-vitamine K [85], même si le risque hémorragique encouru est inférieur à celui provoqué par un AINS conventionnel [86]. La demi-vie d'élimination des coxibs est très variable, puisqu'elle est courte pour le lumiracoxib, intermédiaire pour le célécoxib et le valdécoxib, et longue pour le rofécoxib et l'étoricoxib. Ceci conditionne généralement le schéma thérapeutique, même si une administration quotidienne de célécoxib s'est révélée aussi efficace qu'une administration biquotidienne dans l'arthrose [87].

En conclusion, la découverte d'au moins 2 iso-enzymes de la cyclooxygénase a bouleversé le monde de la recherche sur l'inflammation et a conduit, en moins d'une dizaine d'années, à la mise sur le marché d'une nouvelle sous-classe d'AINS : les coxibs. L'expérience pharmacologique et clinique a cependant démontré que la dichotomie entre une "bonne" COX-1 et une "mauvaise" COX-2 était beaucoup trop manichéenne et que les

ISC ne sont pas aussi "révolutionnaires" que ce qui était attendu. Il n'en demeure pas moins que ces molécules ne sont pas équivalentes en termes de sélectivité pour COX-2 et que le développement de coxibs de "deuxième génération" ayant une sélectivité accrue permettra de tester les limites de ce concept thérapeutique.

RÉFÉRENCES

1. Simon LS. Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Curr Opin Rheumatol 1995;7:159-66.
2. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol 1971;231:232-5.
3. Lichtenstein DR, Syngal S, Wolfe MM. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract. The double-edged sword. Arthritis Rheum 1995;38:5-18.
4. Brater DC. Anti-inflammatory agents and renal function. Semin Arthritis Rheum 2002;32:33-42.
5. 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;53:563-82.
6. Eberhart CE, Dubois RN. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. Gastroenterology 1995;109:285-301.
7. Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002;68-69:3-58.
8. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. N Engl J Med 2001;345:433-42.
9. Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. Adv Immunol 1996;62:167-215.
10. Ouellet M, Percival MD. Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms. Arch Biochem Biophys 2001;387:273-80.
11. 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 B_2 production. Inflamm Res 1996;45:246-53.
12. Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, et al. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase-1 and -2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. Gastroenterology 1996;111:445-54.
13. 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 a selective inhibitor of COX-2. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:272-7.
14. Chang WC, Tai HH. Changes in prostacyclin and thromboxane biosynthesis and their catabolic enzyme activity in kidneys of aging rats. Life Sci 1984;34:1269-80.
15. Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, Kudo I. Prostaglandin E synthase. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002;68-69:383-99.
16. Negishi M, Koizumi T, Ichikawa A. Biological actions of delta 12-prostaglandin J_2. J Lipid Mediat Cell Signal 1995;12:443-8.
17. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol 2002;2:787-95.
18. Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. J Lipid Res 2000;41:163-81.
19. Carroll MA, Balazy M, Margiotta P, Falck JR, McGiff JC. Renal vasodilator activity of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid depends upon conversion by cyclooxygenase and release of prostaglandins. J Biol Chem 1993;268:12260-6.
20. Bylund J, Hidestrand M, Ingelman-Sundberg M, Oliw EH. Identification of CYP4F8 in human seminal vesicles as a prominent 19-hydroxylase of prostaglandin endoperoxides. J Biol Chem 2000;275:21844-9.
21. Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. Trends Pharmacol Sci 2002;23:360-6.
22. McNamara P, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostane activation of the nuclear hormone receptor PPAR. Adv Exp Med Biol 2002;507:351-5.
23. Gao L, Zackert WE, Hasford JJ, Danekis ME, Milne GL, Remmert C, et al. Formation of prostaglandins E_2 and D_2 *via* the isoprostane pathway: a mechanism for the generation of bioactive prostoglandins independent of cyclooxygenase. J Biol Chem 2003;278:28479-89.
24. Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowith JB. Arachidonic acid metabolism. Annu Rev Biochem 1986;55:69-102.
25. Langenbach R, Loftin C, Lee C, Tiano H. Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions. Biochem Pharmacol 1999;58:1237-46.
26. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, van de Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J 1998;12:1063-73.
27. Shiff SJ, Rigas B. The role of cyclooxygenase inhibition in the antineoplastic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs). J Exp Med 1999;190:445-50.
28. Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. J Clin Invest 2001;107:1491-5.
29. Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002;68-69:535-56.
30. Schuster VL. Prostaglandin transport. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002;68-69:633-47.
31. Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G. Intracellular measurement of prostaglandin E_2: effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. Anal Biochem 1999;271:18-28.
32. Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. Science 1995;268:866-9.
33. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:4318-23.
34. Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. Recent Prog Horm Res 2001;56:239-63.
35. Flower RJ, Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). Nature 1972;240:410-1.
36. Smith WL, Lands WE. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. Biochemistry 1972;11:3276-85.
37. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H_2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. J Biol Chem 1990;265:16737-40.
38. 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.
39. Kulkarni SK, Jain NK, Singh A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. Methods Find Exp Clin Pharmacol 2000;22:291-8.

40. Botting RM. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase-3? Clin Infect Dis 2000;31 Suppl 5:S202-S210.

41. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:13926-31.

42. Fiorucci S, de LO, Jr., Mencarelli A, Palazzetti B, Distrutti E, McKnight W, et al. Cyclooxygenase-2-derived lipoxin A4 increases gastric resistance to aspirin-induced damage. Gastroenterology 2002; 123:1598-606.

43. 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;274:16162-7.

44. Schwab JM, Schluesener HJ, Laufer S. COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? Lancet 2003;361:981-2.

45. Ueno N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, Urade Y, et al. Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A_2. J Biol Chem 2001;276:34918-27.

46. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, Dewitt DL, et al. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. J Biol Chem 1995;270:10902-8.

47. 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;273:9886-93.

48. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H_2 synthase-1. Nature 1994;367:243-9.

49. 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;3:927-33.

50. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. Nature 1996;384:644-8.

51. Hawkey CJ. COX-2 inhibitors. Lancet 1999;353:307-14.

52. Mancini JA, O'Neill GP, Bayly C, Vickers PJ. Mutation of serine-516 in human prostaglandin G/H synthase-2 to methionine or aspirin acetylation of this residue stimulates 15-R-HETE synthesis. FEBS Lett 1994;342:33-7.

53. Garavito RM, Malkowski MG, Dewitt DL. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2002;68-69:129-52.

54. Battistini B, Botting R, Bakhle YS. Cox-1 and Cox-2: Towards the development of more selective NSAIDs. Drugs N Perspec 1994;7:501-12.

55. Pairet M. Inhibition ofd cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. Analysis of the *in vitro* test systems and their clinical relevance. J Clin Rheumatol 1998;4:S17-S25.

56. Frolich JC. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. Trends Pharmacol Sci 1997;18: 30-4.

57. Vane JR. NSAIDs, Cox-2 inhibitors, and the gut. Lancet 1995;346: 1105-6.

58. 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;48:623-31.

59. Patrono C, Patrignani P, Garcia Rodriguez LA. Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. J Clin Invest 2001;108:7-13.

60. Ouellet M, Percival MD. Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. Biochem J 1995;306 (Pt 1): 247-51.

61. 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;96:7563-8.

62. Panara MR, Padovano R, Sciulli MG, Santini G, Renda G, Rotondo MT, et al. Effects of nimesulide on constitutive and inducible prostanoid biosynthesis in human beings. Clin Pharmacol Ther 1998;63:672-81.

63. Blain H, Boileau C, Lapicque F, Nedelec E, Loeuille D, Guillaume C, et al. Limitation of the *in vitro* whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use. Br J Clin Pharmacol 2002; 53:255-65.

64. Vane JR, Warner TD. Nomenclature for COX-2 inhibitors. Lancet 2000;356:1373-4.

65. 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;66:425-30.

66. Lipsky LP, Abramson SB, Crofford L, Dubois RN, Simon LS, van de Putte LB. The classification of cyclooxygenase inhibitors. J Rheumatol 1998;25:2298-303.

67. Pairet M, Netter P. [Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: importance and limitations]. Therapie 1999;54:433-45.

68. Cipollone F, Ganci A, Panara MR, Greco A, Cuccurullo F, Patrono C, et al. Effects of nabumetone on prostanoid biosynthesis in humans. Clin Pharmacol Ther 1995;58:335-41.

69. Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med 1998;104:413-21.

70. 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.

71. Futaki N, Yoshikawa K, Hamasaka Y, Arai I, Higuchi S, Iizuka H, et al. NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. Gen Pharmacol 1993;24:105-10.

72. Ligumsky M, Golanska EM, Hansen DG, Kauffman GL, Jr. Aspirin can inhibit gastric mucosal cyclo-oxygenase without causing lesions in rat. Gastroenterology 1983;84:756-61.

73. Wallace JL, Chapman K, McKnight W. Limited anti-inflammatory efficacy of cyclo-oxygenase-2 inhibition in carrageenan-airpouch inflammation. Br J Pharmacol 1999;126:1200-4.

74. Talley JJ. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). Prog Med Chem 1999;36:201-34.

75. Scott LJ, Lamb HM. Rofecoxib. Drugs 1999;58:499-505.

76. Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. Clin Pharmacokinet 2000;38:225-42.

77. Talley JJ, Bertenshaw SR, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ, Kellogg MS, et al. 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 2000;43: 1661-3.

78. Cochrane DJ, Jarvis B, Keating GM. Etoricoxib. Drugs 2002;62:2637-51.

79. Ormrod D, Wellington K, Wagstaff AJ. Valdecoxib. Drugs 2002;62: 2059-71.

80. Sorbera LA, Castaner J, Bayes M, Silvestre JS. Lumiracoxib. Drugs Fut 2002;27:740-7.

81. Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dube D, Ethier D, et al. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. J Pharmacol Exp Ther 2001;296:558-66.

82. Stichtenoth DO, Frolich JC. The second generation of COX-2 inhibitors: what advantages do the newest offer? Drugs 2003;63:33-45.

83. Barden J, Edwards JE, McQuay HJ, Moore RA. Oral valdecoxib and injected parecoxib for acute postoperative pain: a quantitative systematic review. BMC Anesthesiol 2003;3:1-8.

84. Landrum-Michalets E. Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. Pharmacotherapy 1998;18:84-112.

85. Haase KK, Rojas-Fernandez CH, Lane L, Frank DA. Potential interaction between celecoxib and warfarin. Ann Pharmacother 2000;34:666-7.

86. Knijff-Dutmer EA, van der PJ, Schut G, van de Laar MA. The influence of cyclo-oxygenase specificity of non-steroidal anti-inflammatory drugs on bleeding complications in concomitant coumarine users. QJM 2003;96:513-20.

87. Williams GW, Hubbard RC, Yu SS, Zhao W, Geis GS. Comparison of once-daily and twice-daily administration of celecoxib for the treatment of osteoarthritis of the knee. Clin Ther 2001;23:213-27.

Thérapie 2004 Mar-Avr; 59 (2): 207-211
0040-5957/04/0002-0207/$31.00/0

© 2004 Société Française de Pharmacologie

Place des coxibs dans l'arsenal thérapeutique : quelques certitudes et beaucoup de doutes

Therapeutic Advances with Coxibs: Few Certainties and a Lot of Doubts

Jean-Yves Jouzeau,[1,2] *Mikaël Daouphars*[1] et *Patrick Netter*[1,2]

1 Laboratoire de Pharmacologie et UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine de Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, France
2 Service de Pharmacologie Clinique et Toxicologie, CHU de Nancy, Hôpital Central, Nancy, France

Mots clés : cyclo-oxygénases, anti-inflammatoires non stéroïdiens, sélectivité, coxibs
Keywords: cyclo-oxygenases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, selectivity, coxibs

Texte reçu le 6 mai 2003 ; accepté le 19 décembre 2003

1. De quelles molécules parle-t-on ?

Les coxibs sont des inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2).[1] Il s'agit avant tout d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) n'inhibant pas l'activité de COX-1 et non de molécules inhibant plus efficacement l'activité de COX-2 que les AINS classiques.[2] Leur sélectivité vis-à-vis des isoenzymes de la cyclo-oxygénase est déterminée *in vitro* à l'aide du système dit « sang total ». Dans ce système, l'activité inhibitrice sur COX-1 est mesurée par la synthèse de thromboxane B_2, métabolite stable du thromboxane A_2, consécutive à l'activation plaquettaire par la thrombine lors de la coagulation spontanée (1 h à 37°C) et l'activité inhibitrice sur COX-2 par la synthèse de prostaglandine E_2 lors de l'activation monocytaire par une endotoxine bactérienne (10 µg/mL de lipopolysaccharide [LPS] pendant 24 h à 37°C). Ceci permet d'établir un indice de sélectivité correspondant au rapport des concentrations inhibant 50 % de l'activité enzymatique sur chacune des isoenzymes ($CI_{50COX-1}/CI_{50COX-2}$), la sélectivité pour COX-2 étant d'autant plus grande que cet indice est élevé.[3] Cette sélectivité biochimique est confirmée en situation clinique après absorption orale de la posologie maximale recommandée de l'AINS. Une sélectivité pour COX-2 se traduit alors par l'absence d'inhibition de l'activité COX-1 plaquettaire mesurée *ex vivo*, en prenant soin toutefois de ne mesurer ce pouvoir inhibiteur que lorsque les concentrations circulantes d'AINS sont maximales, c'est-à-dire après prise répétée du médicament, puisqu'il existe un facteur d'accumulation de 1,5 à 2 pour les molécules à demi-vie longue.[4] Une autre démonstration de cette sélectivité pour COX-2, beaucoup moins usitée pour des raisons éthiques évidentes, est de vérifier l'absence d'inhibition de l'activité COX-1 dans des biopsies gastriques. Il faut cependant préciser plusieurs points ayant une répercussion clinique : (i) la sélectivité étant déterminée sur une inhibition des enzymes sanguines, il faut considérer que, compte tenu des concentrations locales d'AINS susceptibles d'excéder largement les concentrations circulantes, la probabilité d'une absence d'inhibition de la COX-1 tissulaire n'a de pertinence que pour un indice de sélectivité élevé ; (ii) la synthèse du thromboxane est un indicateur beaucoup plus sensible de l'effet inhibiteur des AINS que les tests d'agrégation plaquettaire, de sorte qu'une inhibition substantielle de ce paramètre biologique peut être observée sans répercussion sur les tests plaquettaires ;[5] (iii) à l'inverse, l'inhibition de la biosynthèse du thromboxane ne peut pas être directement reliée à un pouvoir protecteur cardiovasculaire, puisqu'une inhibition prolongée et *quasi*-totale de cette activité est requise pour obtenir un effet antithrombotique cliniquement démontré ;[6] et (iv) sur la base des mesures *in vitro* et *ex vivo*, le rofécoxib Vioxx® est un inhibiteur plus sélectif de COX-2 que le célécoxib Célébrex®.[3]

2. Principales différences pharmacologiques entre les coxibs non injectables commercialisés en France

Hormis leur différence de sélectivité pour COX-2, les coxibs diffèrent principalement par :[7,8] (i) leur biodisponibilité par voie orale, qui est de 92–93 % pour le rofécoxib et de 25–40 % pour

le célécoxib ; (ii) leur volume apparent de distribution, qui est de 70–90 L pour le rofécoxib et de 300–600 L pour le célécoxib, ceci étant probablement lié à leur différence de biodisponibilité par voie orale ; (iii) leur biotransformation hépatique, faisant appel à une contribution moins importante des cytochromes P450 pour le rofécoxib que pour le célécoxib et à l'intervention d'une enzyme régulée par un polymorphisme génétique (cytochrome P450 [CYP] 2C9) pour le célécoxib ; (iv) leur effet inhibiteur faible sur les enzymes de biotransformation des médicaments, concernant le CYP1A2 pour le rofécoxib et le CYP2D6 pour le célécoxib ; et (v) leur demi-vie d'élimination, qui est plus longue pour le rofécoxib (17 h) que pour le célécoxib (8–12 h).

3. Particularités structurales des coxibs

Les coxibs commercialisés en France se caractérisent chimiquement par :[9] (i) l'absence de fonction acide carboxylique, ce qui leur confère un pouvoir irritant digestif réduit mais est directement responsable de leur faible hydrosolubilité et de la difficulté de mettre au point des formes injectables de ces molécules ; (ii) une structure volumineuse et assez rigide comprenant au moins deux grands cycles aromatiques, ce qui leur confère probablement une liposolubilité supérieure aux AINS classiques ; et (iii) la présence de groupements fonctionnels méthylsulfone pour le rofécoxib ou sulfonamide pour le célécoxib, ce qui expose au risque de réaction allergique croisée avec le célécoxib chez les patients ayant des antécédents d'allergie aux sulfamides (para-amino-sulfonamides). On remarquera que la plupart des coxibs en développement dans l'industrie pharmaceutique, ou en cours d'enregistrement auprès des autorités sanitaires, ont des structures proches de ces premières molécules, dont elles conservent la structure tricyclique et les groupements fonctionnels méthylsulfone pour l'étoricoxib Arcoxia®[10] ou sulfonamide pour le valdécoxib Bextra®[11] et sa prodrogue injectable le parécoxib Dynastat®,[12] et ne diffèrent principalement que par la nature de l'hétérocycle central : pyridinyl pour l'étoricoxib au lieu de furanone pour le rofécoxib, isoxazole pour le valdécoxib au lieu de pyrazole pour le célécoxib. Cependant, l'homogénéité structurale du groupe des coxibs n'est pas définitive puisque de nouvelles structures chimiques font leur apparition comme le lumiracoxib Prexige®,[13] actuellement en phase III de développement clinique, qui est une molécule proche du diclofénac ayant un squelette d'acide phénylacétique et dépourvu de groupements sulfonés.

4. Comparaison pragmatique des coxibs et des AINS classiques

Sur la base des données publiées, on peut faire l'anal suivante :

Les coxibs ont quelques avantages par rapport aux AI classiques car

- ils réduisent d'environ 40–50 % le risque gastroduodé sévère (ulcères symptomatiques et leurs compli tions),[14,15] ce qui participe probablement à l'indicati préventive du célécoxib dans la polypose familiale aux Eta Unis ;
- ils réduisent d'environ 50 % le risque intestinal sévère, hormis le cas particulier des entérocolopathies i flammatoires ;
- ils ne provoquent pas de réaction de déclenchement chez patients souffrant « d'intolérance à l'aspirine »,[17] bien q cela soit actuellement une de leurs contre-indications ;
- ils procurent une récurrence d'ulcères gastroduodénaux à mois identique à celle observée avec un traitement associa un AINS classique et une cytoprotection (inhibiteur pompe à protons) chez des patients non infectés p *Helicobacter pylori*.[18]

Les coxibs restent malgré tout des AINS car

- ils reproduisent les effets indésirables rénaux des AI classiques chez les patients à risque (hypertension m contrôlée, hypovolémie...) ;[19]
- ils sont responsables d'interactions médicamenteus similaires à celles des AINS classiques et ont des contr indications qui leurs sont superposables ;
- ils apportent très peu d'amélioration par rapport aux AI classiques en termes de troubles digestifs symptomatiques type dyspepsie, nausées ou modification de transit.[14,15]

Les coxibs ont quelques inconvénients par rapport aux AI classiques car

- certains possèdent un pouvoir immuno-allergisant lié à le structure chimique de type sulfonamide (célécoxi valdécoxib et parécoxib) ;[20]
- leur coût journalier de traitement est très supérieur à cel des AINS classiques, surtout si on les compare avec l génériques de ces derniers ;
- ils peuvent exacerber les entérocolopathies inflammatoir ce qui explique leur contre-indication dans ces circonstance même si cet inconvénient est probablement partagé avec l AINS classiques et a surtout été démontré dans des modèl animaux de colites ;[21]
- certains possèdent un pouvoir tératogène expérimental, qu' est probablement impossible de démontrer pour les AI classiques en raison de leur trop grande toxicité digestiv

© 2004 Société Française de Pharmacologie

mais qui justifie, selon le principe de précaution, l'obligation d'une contraception efficace lors de la prescription de célécoxib chez la femme ;

- ils pourraient favoriser l'apparition d'accidents thrombotiques chez les patients à risque cardiovasculaire[22] (syndrome des antiphospholipides par exemple),[23] même si le pouvoir protecteur des AINS classiques n'a été démontré cliniquement à ce jour que pour l'indobufène (non commercialisé en France), le flurbiprofène et l'aspirine.

5. Principales propriétés des coxibs non encore enregistrés en France

Ces « nouveaux » coxibs, parfois appelés coxibs de « deuxième génération »,[12] se distinguent des précédents par deux caractéristiques essentielles :[10-13] (i) une sélectivité accrue vis-à-vis de COX-2 (indice de sélectivité supérieur à celui du célécoxib pour le valdécoxib, et nettement supérieur à celui du rofécoxib pour l'étoricoxib et le lumiracoxib) ; et (ii) une action plus rapide, cohérente avec des t_{max} (temps auquel la concentration maximale est observée) plus courts (1 h pour étoricoxib, 2–3 h pour valdécoxib et lumiracoxib au lieu de 2–4 h pour célécoxib et rofécoxib), qui améliore leur efficacité dans la prise en charge de la douleur. Ces molécules ont, par ailleurs, des caractéristiques pharmacocinétiques qui les distinguent entre elles comme leur demi-vie (3–6 h pour le lumiracoxib, 5–10 h pour le valdécoxib, 22 h pour l'étoricoxib) ou leur biotransformation hépatique (dépendante majoritairement du CYP3A4 pour l'étoricoxib et des CYP3A4 et 2C9 pour le valdécoxib).

6. Réflexions sur la place des coxibs dans l'arsenal thérapeutique

En termes de toléranee digestive, indépendamment de la polémique[24] ayant eu lieu à propos de l'interprétation des données de l'étude CLASS (Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study)[25] (analyse à 6 mois au lieu de 1 an, signification statistique sur le critère secondaire mais pas sur le critère primaire d'évaluation), il faut reconnaître que le bénéfice apporté par les coxibs n'est peut-être pas aussi important que celui attendu.[14,15] Il n'en demeure pas moins vrai que, d'après les études disponibles, la prescription d'un coxib serait d'autant plus justifiée que le risque digestif serait grand. Ainsi, le nombre de patients à traiter pour éviter un effet indésirable digestif sévère, en prescrivant un coxib au lieu d'un AINS classique, passerait de 42 à 106 chez un patient sans facteur de risque, de 17 à 33 chez un patient à risque modéré, pour tomber de 10 à 12 chez un patient à risque digestif élevé.[26] Ce résultat n'est pas surprenant, puisqu'il est similaire aux conclusions de l'étude MUCOSA (Misoprostol Ulcer Complication Study Outcomes Safety Assessment) ayant conduit à démontrer qu'une cytoprotection par le misoprostol était d'autant plus justifiée que le risque digestif était grand.[27] Il est bon de rappeler que, compte tenu de son coût de traitement journalier élevé, la conséquence immédiate a été de ne pas recommander la coprescription systématique d'une cytoprotection lors d'un traitement par AINS. Si l'on applique la même logique aux coxibs, le recours systématique à leur prescription constitue donc un surcoût qui n'est pas forcément justifié par des critères de santé publique si le patient a une bonne tolérance vis-à-vis des AINS classiques ou s'il s'agit d'un traitement de courte durée.[28] La prescription des coxibs serait donc mieux justifiée chez les patients ayant un risque digestif modéré à sévère,[26] tout en gardant en mémoire que ce choix ne représente une économie, en termes de dépenses de santé, que s'il permet de s'affranchir du recours à une cytoprotection. Plusieurs interrogations sont alors suscitées par l'absence d'études cliniques pertinentes : (i) quelles preuves avons-nous que la protection à long terme vis-à-vis du risque digestif sévère est comparable pour un coxib et pour l'association d'un AINS classique et d'une cytoprotection ? ; (ii) la fréquence des troubles symptomatiques est-elle comparable pour un coxib et pour l'association d'un AINS classique et d'une cytoprotection ? ; (iii) comment situer la tolérance digestive d'un coxib par rapport à celle de l'association d'un AINS classique et d'une cytoprotection chez un patient infecté par *H. pylori* ou dont le statut vis-à-vis de cette bactérie est inconnu ? (pour mémoire, il n'est pas recommandé de déterminer le statut *H. pylori* d'un patient avant de lui prescrire un AINS) ; et (iv) existe-t-il des cas pouvant justifier l'association d'un coxib et d'une cytoprotection digestive (risque digestif maximal, troubles symptomatiques responsables d'un arrêt de traitement ...) ?

En termes de tolérance rénale, le bénéfice modeste apporté par les coxibs n'est perceptible que chez les sujets sains, c'est-à-dire qu'il n'existe pas chez les patients ayant les facteurs de risque qui exposent aux effets délétères des AINS classiques :[19] sujets hypertendus, hypovolémiques... Il n'y a donc aucune justification de la prescription d'un coxib pour limiter le risque rénal. Les effets indésirables observés (troubles hydroélectrolytiques, œdème, élévation tensionnelle) sont généralement dose-dépendants,[29] de sorte qu'il est recommandé de ne prescrire que les plus faibles posologies efficaces, d'autant qu'il n'existe pas de protection pharmacologique disponible. Une vigilance particulière doit être exercée chez le sujet âgé puisqu'il est physiologiquement prédisposé aux effets indésirables rénaux des AINS et que, étant donné que l'âge est le principal facteur de risque digestif sévère, il est susceptible de se voir prescrire préférentiellement un coxib.

© 2004 Société Française de Pharmacologie

En termes de tolérance cardiovasculaire, l'inhibition sélective de COX-2 a le désavantage de déséquilibrer la balance entre la synthèse de thromboxane d'origine plaquettaire (dépendante de COX-1 et non inhibée par les coxibs) et celle de prostacycline d'origine endothéliale.[30] Ce que l'on sait depuis peu, c'est que cette balance, qui fut longtemps discutée à propos des posologies antithrombotiques d'aspirine, est probablement étroitement dépendante de l'expression de COX-2 dans l'endothélium vasculaire. Ainsi, une diminution significative des taux circulants de prostacycline a été rapportée après administration orale des coxibs.[31] Parallèlement, quelques cas de thrombose ont été rapportés chez des patients souffrant de connectivite traités par célécoxib[23] et une augmentation de la fréquence d'infarctus du myocarde a été observée chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde traités au long cours par rofécoxib (étude VIGOR [Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research]).[32] Ces données suggèrent que les coxibs pourraient augmenter le risque thrombotique chez les sujets à risque cardiovasculaire, pour lesquels une coprescription d'aspirine à faible posologie (≤ 325 mg/jour) est recommandée.[33] Il existe d'ailleurs des données expérimentales et cliniques démontrant que l'effet inhibiteur de l'aspirine sur la COX-1 plaquettaire serait plus efficace en présence d'un coxib que d'un AINS classique (ibuprofène).[34] En revanche, on ne dispose que d'une seule étude clinique (étude CLASS) montrant que la coprescription d'aspirine supprimerait le bénéfice d'un coxib par rapport à un AINS classique, en termes d'effets indésirables digestifs sévères.[25] La pertinence de l'étude est cependant discutable sur ce point car les conclusions ont été obtenues à partir d'effectifs réduits (20 % seulement des patients bénéficiaient d'une coprescription d'aspirine dans chaque groupe).[33] Enfin, on ignore si, chez des patients associant un risque digestif et cardiovasculaire maximal, la coprescription d'aspirine et d'un coxib apporte la même protection que celle d'un AINS classique, d'aspirine et d'une cytoprotection. On ne sait d'ailleurs pas non plus si, dans ce cas très particulier, il y a une justification à ajouter une cytoprotection à la coprescription d'un coxib et d'aspirine.

En termes de comparaison des coxibs entre eux, on ne peut que constater la difficulté d'interprétation des données cliniques disponibles. Un élément clé de ce problème est que, à la différence des études versus AINS classiques, les posologies utilisées dans les comparaisons entre coxibs ne correspondent pas à la réalité clinique : posologie maximale de rofécoxib (50 mg en prise unique) contre posologie faible de célécoxib (200 mg) dans le traitement de la douleur dentaire (posologies et indications non retenues en France),[35] posologie faible de célécoxib (200 mg/jour) contre posologie maximale de rofécoxib (25 mg/jour) dans l'étude du risque tc sionnel chez les patients arthrosiques.[36]

Références

1. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenas N Engl J Med 2001; 345: 433-42
2. Vane JR, Warner TD. Nomenclature for COX-2 inhibitors. Lancet 2000; 3 1373-4
3. Patrono C, Patrignani P, Garcia-Rodriguez LA. Cyclooxygenase-selective inh tion of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clin read-outs. J Clin Invest 2001; 108: 7-13
4. Blain H, Boileau C, Lapicque F, et al. Limitation of the *in vitro* whole blood as for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use. Br J Clin Pl macol 2002; 53: 255-65
5. De Meijer A, Vollaard H, De Metz M, et al. Meloxicam, 15 mg/day, spares plat function in healthy volunteers. Clin Pharmacol Ther 1999; 66: 425-30
6. Reilly IAG, FitzGerald GA. Inhibition of thromboxane formation *in vivo* and *vivo*: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. Blood 1987; 180-6
7. Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, et al. Clinical pharmacokinetics and pl macodynamics of celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. C Pharmacokinet 2000; 38: 225-42
8. Scott LJ, Lamb HM. Rofecoxib. Drugs 1999; 58: 499-505
9. de Leval X, Julémont F, Delarge J, et al. New trends in dual LOX/COX inhibiti Curr Med Chem 2002; 9: 941-62
10. Cochrane DJ, Jarvis B, Keating GM. Etoricoxib. Drugs 2002; 62: 2637-51
11. Ormrod D, Wellington K, Wagstaff AJ. Valdecoxib. Drugs 2002; 62: 2059-71
12. Stichtenoth DJ, Frölich JC. The second generation of COX-2 inhibitors: w advantages do the newest offer? Drugs 2003; 63: 33-45
13. Sorbera LA, Castaner J, Bayes M, et al. Lumiracoxib. Drugs Future 2002; 740-7
14. Laine L. Gastrointestinal effects of NSAIDs and coxibs. J Pain Symptom Mana 2003; 25 (2 Suppl.): S32-40
15. Bombardier C. An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety coxibs. Am J Cardiol 2002; 89 (6A): 3D-9D
16. Laine L, Connors LG, Reicin A, et al. Serious lower gastrointestinal clinical eve with non selective NSAID or coxib use. Gastroenterology 2003; 124: 288-9
17. Woessner KM, Simon RA, Stevenson DD. The safety of celecoxib in patients w aspirin-sensitive asthma. Arthritis Rheum 2002; 46: 2201-6
18. Chan FKL, Hung LCT, Suen BY, et al. Celecoxib versus diclofenac and o eprazole in reducing the risk of recurrent ulcer bleeding in patients with arth tis. N Engl J Med 2002; 347: 2104-10
19. Perazella MA, Tray K. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: a pattern of nep rotoxicity similar to traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am Med 2001; 111: 64-7
20. Knowles S, Shapiro L, Shear NH. Should celecoxib be contraindicated in patie who are allergic to sulfonamides?: revisiting the meaning of 'sulfa' aller Drug Saf 2001; 24: 239-47
21. Reuter BK, Asfaha S, Buret A, et al. Exacerbation of inflammation-associat colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. J Clin Invest 19 98: 2076-85
22. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated w selective COX-2 inhibitors. JAMA 2001; 286: 954-9
23. Crofford LJ, Oates JC, McCune WJ, et al. Thrombosis in patients with connecti tissue diseases treated with specific cyclooxygenase 2 inhibitors: a report four cases. Arthritis Rheum 2000; 43: 1891-6

© 2004 Société Française de Pharmacologie

24. Jüni P, Rutjes AWS, Dieppe PA. Are selective COX 2 inhibitors superior to traditional non steroidal anti-inflammatory drugs? BMJ 2002; 324: 1287-8
25. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, et al. 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 2001; 284: 1247-55
26. Laine L, Bombardier, Hawkey CJ, et al. Stratifying the risk of NSAID-related upper gastrointestinal clinical events: results of a double-blind outcomes study in patients with rheumatoid arthritis. Gastroenterology 2002; 123: 1006-12
27. Silverstein FE, Graham DY, Senior JR, et al. Misoprostol reduces serious gastrointestinal complications in patients with rheumatoid arthritis receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med 1995; 123: 241-9
28. You JH, Lee KK, Chan TY, et al. Arthritis treatment in Hong Kong-cost analysis of celecoxib versus conventional NSAIDS, with or without gastroprotective agents. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 2089-96
29. DeMaria AN, Weir MR. Coxibs: beyond the GI tract: renal and cardiovascular issues. J Pain Symptom Manage 2003; 25 (2 Suppl.): S41-9
30. FitzGerald GA. Cardiovascular pharmacology of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. Am J Cardiol 2002; 89 (6A): 26D-32D
31. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 272-7
32. Bombardier C, Laine L, Reicin A, et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2000; 343: 1520-8
33. Baigent C, Patrono C. Selective cyclooxygenase inhibitors, aspirin, and cardiovascular disease. Arthritis Rheum 2003; 48: 12-20
34. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. N Engl J Med 2001; 345: 1809-17
35. Malmstrom K, Daniels S, Kotey P, et al. Comparison of rofecoxib and celecoxib, two cyclooxygenase-2 inhibitors, in postoperative dental pain: a randomized, placebo- and active-comparator-controlled clinical trial. Clin Ther 1999; 21: 1653-63
36. Whelton A, White WB, Bello AE, et al. Effects of celecoxib and rofecoxib on blood pressure and oedema in patients > or = 65 years of age with systemic hypertension and osteoarthritis. Am J Cardiol 2002; 90: 959-63

Correspondance et offprints : *Jean-Yves Jouzeau*, Laboratoire de Pharmacologie et UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine de Nancy, avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France.
E-mail : jouzeau@medecine.uhp-nancy.fr

© 2004 Société Française de Pharmacologie

Uncoupling of oxidative phosphorylation and Smac/DIABLO release are not sufficient to account for induction of apoptosis by sulindac sulfide in human colorectal cancer cells

MIKAEL DAOUPHARS[1], MERIEM KOUFANY[1], ALEXANDRE BENANI[1], SOPHIE MARCHAL[2], JEAN-LOUIS MERLIN[2], PATRICK NETTER[1] and JEAN-YVES JOUZEAU[1]

[1]Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires, UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré, 54 505 Vandœuvre-lès-Nancy cedex; [2]Centre Alexis Vautrin, Laboratoire de Recherchеen Oncologie, 54 511 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France

Abstract. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have shown chemopreventive properties in colorectal cancer, involving both cyclooxygenase (COX)-dependent and -independent mechanisms. Apart from their selectivity for COX isoenzymes, NSAIDs differ in their acidic character which supports ability to uncouple oxidative phosphorylation. To assess the possible contribution of uncoupling to their antineoplastic properties, we compared the effect of sulindac sulfide (SS), an acidic NSAID and NS-398, a non-acidic tricyclic, on mitochondrial function and apoptosis in colorectal cancer cell lines (HT29, Caco-2, HCT15 and HCT116). Although cell lines displayed a different COX status, SS and NS-398 caused growth arrest in a dose-related manner. High dose (10^{-4}M) of SS but not of NS-398, increased the percentage of subG$_1$ cell population while reducing mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$). Cyclosporin A (CsA, 1 μM) prevented collapse of $\Delta\Psi_m$ induced by 10^{-4}M SS but not by 7.5 μM FCCP used as a protonophoric control. SS and FCCP increased the cytosolic release of Smac/DIABLO which was differently affected by CsA pre-treatment depending on the uncoupler. Finally, 7.5 μM FCCP failed to induce apoptosis whereas CsA prevented apoptosis induced by SS from 16% in HCT15 to 41% in HCT116. The present study shows that despite the ability of sulindac sulfide to behave as a protonophoric uncoupler, CsA-sensitive opening of mitochondrial permeability transition pore contributes little to its pro-apoptotic effect in colorectal cancer cells.

Correspondence to: Professor Jean-Yves Jouzeau, UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France
E-mail: jouzeau@medecine.uhp-nancy.fr

Key words: apoptosis, colorectal cancer, cyclooxygenase, non-steroidal anti-inflammatory drug, mitochondria, Smac/DIABLO

Introduction

Results from both epidemiological studies and animal models of colon carcinogenesis have indicated that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have antineoplastic properties, and could serve as effective cancer chemopreventive agents (1). Cyclooxygenase (COX), the enzyme that converts arachidonic acid into prostaglandins (PGs), is the major target of NSAIDs (2). It has been cloned as, at least, two isoforms: a constitutive one, COX-1, located in most tissues, and an inducible one, COX-2, expressed mainly in response to pro-inflammatory cytokines and growth factors. COX-2 is almost absent in normal intestinal mucosa but is overexpressed in colonic cancers, as well as their precursor lesions (3), accounting for increased prostaglandin levels in abnormal tissues (4) and maximal expression of COX-2 in advanced Dukes' stage (5). Conversely, the transfer of COX-2 cDNA into intestinal cells confers resistance to apoptosis and tumorigenic potential (6). Moreover, studies in *APC*$^{\Delta 716}$ knockout mice have shown that COX-2 allele deletion is associated with a reduction in polyp size and number (7), consistent with the dramatic decrease of polyp formation induced by traditional and COX-2 selective NSAIDs in animal models of FAP or carcinogen-induced cancers (8).

Several works support the ideas that COX-2 expression is a key element of colorectal carcinogenesis whereas anticancer properties of NSAIDs may involve apoptotic mechanisms. However, although NSAIDs induce apoptosis in neoplastic cells *in vitro* (9-11) and *in vivo* (12), the contribution of COXs-inhibition to this process remains controversial (13). On one hand, accumulation of arachidonic acid, secondary to COX inhibition, activated the proapoptotic ceramide pathway in HCT116 cells (14). Moreover, PGE_2, the major COX product from colonic tumors, was shown to reverse the proapoptotic effect of a selective COX-2 inhibitor in HCA-7 cells (15,16). On the other hand, compounds devoid of COX inhibitory potency as sulindac sulfone (exisulind) were able to induce

programmed cell death in HT29 cancer cells (17), while traditional NSAIDs were able to favor apoptosis in HCT15 colon adenocarcinoma cells which lack cyclooxygenase transcripts (18).

Thus, the prevention of colorectal cancer by NSAIDs has been largely discussed through their ability to inhibit COX isoenzymes. However, little attention has been paid to the possible involvement of their physico-chemical properties in these chemopreventive effects. This point warrants attention since, apart from their original COX inhibitory profile, selective COX-2 inhibitors differ greatly from traditional NSAIDs on a structural basis and lack any acidic character. The latter property, common to conventional carboxylic and enolic NSAIDs, confers them the ability to act as uncouplers of mitochondrial oxidative phosphorylation, which could account for variability in the antineoplastic potency of COX inhibitors. We investigated therefore whether changes in mitochondrial transmembrane potential could account for proapoptotic properties of NSAIDs in four human colorectal cancer cell lines: HT29, Caco-2, HCT15 and HCT116. We compared the effects of sulindac sulfide, an acidic non-selective NSAID and NS-398, a non-acidic COX-2 selective NSAID, on proliferation and apoptosis (subG$_1$ peak). Changes in mitochondrial function were checked by monitoring mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) with JC-1 staining, and mitochondrial permeabilization through the release of Smac/DIABLO, using the classic uncoupler FCCP as control.

Materials and methods

Reagents and antibodies. Sulindac sulfide was a generous gift from Merck, Sharp and Dohme (Rahway, NJ, USA). NS-398 was purchased from Biomol (Plymouth, UK). JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazol-carbocyanine iodide) and FCCP [carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone] were from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). Cyclosporin A (CsA) and all other chemicals were from Sigma (St. Quentin - Fallavier, France).

Rabbit polyclonal antibodies against human COX-1, COX-2 and ß-actin were purchased from Santa Cruz (Tébu, Le Perray en Yvelines, France), whereas that recognizing the mature form of human Smac/DIABLO was from Calbiochem (France Biochem, Meudon, France).

Cell lines. Human colorectal cell lines HT29, Caco-2, HCT15 and HCT116 were from the European Collection of Animal Cell Cultures (Cerdic, Sophia-Antipolis, France). Cells were cultured in DMEM/Ham's F-12 medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin and 0.5 µg/ml amphotericin B (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37°C. Cells were seeded at a density of $25x10^3/cm^2$ and allowed to grow for 3 days prior to exposure to test reagents. At day 3, cells were exposed to NSAIDs dissolved in DMSO, so that the final concentration of DMSO did not exceed 0.5% in culture medium. Controls received 0.5% DMSO only.

Determination of COX levels. Cells were washed once with PBS and incubated for 30 min in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.4, 1% Triton) supplemented with a protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics, Meylan, France). Whole cell lysates were centrifuged at 17,000 g for 10 min at 4°C and supernatants were stored at -20°C until use. Protein extracts (25 µg) were electrophoresed on 10% SDS-PAGE before immunotransfer. Blots were incubated overnight at 4°C with anti-COX-1 (1/500), anti-COX-2 (1/250), or anti-ß-actin (1/400) antibodies. Revelation was carried out with BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Roche Diagnostics).

Cell proliferation analysis. After single exposure to NSAIDs, adherent cells were harvested by trypsinization, resuspended in culture medium and counted using a hemacytometer. Cell proliferation was expressed as the percentage of growth by setting the value 100% to the cells treated with vehicle only (DMSO). Analyses were performed in triplicate and results correspond to three separate experiments. IC_{50} values were calculated using SigmaPlot™ software (SPSS Inc.).

Apoptosis. Apoptosis was evaluated by FACS after PI staining, to detect subdiploid peaks of DNA content. Briefly, floating and adherent cells were collected and fixed with ice-cold 95% ethanol, centrifuged for 5 min at 200 g, then resuspended in ice-cold 70% ethanol and stored for 30 min at 4°C. Cells were finally washed twice with PBS and labeled in a 50 µg/ml PI solution containing 0.1% Triton X-100, 0.1 mM EDTA and 25 µg/ml RNase A. Total DNA content per cell was quantified by fluorescence at 585 nm with a Coulter's Epic 752 model flow cytometer.

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). The fluorescent probe JC-1 was used to measure the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) of cells by FACS. At low values of $\Delta\Psi_m$ (de-energized cells), JC-1 diffuses throughout the cells as a monomer emitting a green fluorescence, whereas it accumulates into mitochondria to form aggregates with red fluorescence at high $\Delta\Psi_m$. Briefly, following an 18 h exposure to NSAIDs, 10^6 cells were harvested by trypsinization, resuspended in 1 ml of culture medium supplemented with 5 µg/ml of JC-1, then incubated for 15 min at 37°C. Cells were pelleted at 150 g for 5 min, washed twice in PBS before FACS. The analyzer threshold was adjusted on the forward light scatter channel at the same value for all cell lines. Photomultiplier settings were adjusted to detect JC-1 monomer fluorescence signals on the filter 1 (FL1) detector (green fluorescence, centered at 537 nm) and JC-1 aggregate fluorescence signals on the FL2 detector (red fluorescence, centered at 597 nm). Mean fluorescence intensity values for FL1 and FL2, expressed as relative linear fluorescence channels (arbitrary units scaled from channels 0 to 10,000), were obtained for all experiments. In each experiment, 10,000 events were analyzed. Data are expressed as the respective percentage of high (upper right) and low (low right) $\Delta\Psi_m$ cells, based on fluore-scence intensity values of aggregates (red) and monomers (green) after NSAIDs exposure. Cells exposed to 7.5 µM FCCP for 18 h were used as positive controls.

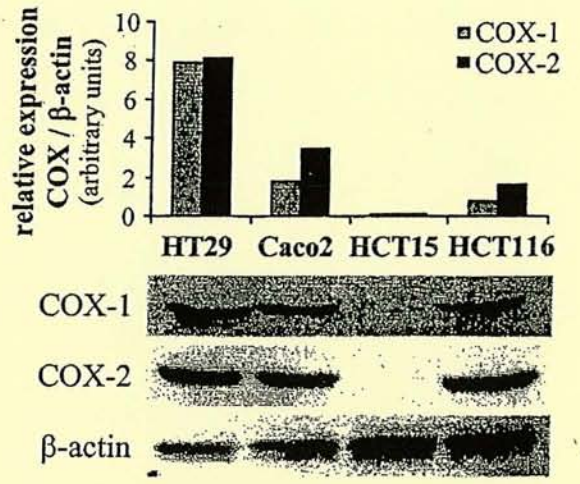


Figure 1. Western blot analysis of COX-1 and COX-2 expression in human colorectal cancer cells. Densitometric values were determined in regard to the ß-actin content on whole cell lysates as described in Materials and methods.

In some experiments, to check for the possible contribution of mitochondrial transition pore (MPT) in $\Delta\Psi_m$ changes, cyclosporin A (CsA), a potent inhibitor of MPT, was added to a final concentration of 1 μM in fresh culture medium, 1 h before exposure to NSAIDs or FCCP.

Analysis of Smac/DIABLO release. After 18 h of incubation with 10^{-4}M NSAIDs or 7.5 μM FCCP, in the presence or absence of 1 μM CsA, cells were harvested by trypsinization, centrifuged at 200 g for 10 min, then washed twice with PBS. After incubation for 2 min at 4°C in an hypotonic buffer (250 nM sucrose, 10 mM TrisHCl pH 7.4) supplemented with the protease inhibitor mixture, cells were lysed by 5 strikes using a Dounce with an A pestle. Homogenates were centrifuged at 14,000 g for 15 min at 4°C, and supernatants were further centrifuged at 60,000 g for 60 min at 4°C before Western blot analysis. Briefly, protein extracts (25 μg) were electrophoresed on 15% SDS-PAGE, then subjected to immunotransfert before overnight incubation of the blot at 4°C with anti-Smac/DIABLO (1/1500) or anti-ß-actin (1/500) antibodies. Revelation was carried out with Phototope-HRP Western Blot Detection System (Ozyme, Montigny-Le-Bretonneux, France).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed on raw data. After analysis of variance (ANOVA), comparisons between groups were determined by the Fisher PLSD *post hoc* test using the Statview™ 5.0 software (SAS Institute Inc.). A value of $p<0.05$ was considered to be significant.

Results

COXs expression profile in cancer cell lines. Western blotting analysis showed a constitutive expression of COX-1 and COX-2 in HT29, Caco-2 and HCT116 cell lines (Fig. 1). In our experimental conditions, COX isoenzymes were detected maximally in HT29 cells, whereas COX-2 tended to be expressed over COX-1 in Caco-2 and HCT116 cell lines. In contrast, no signal for COX isoenzymes was detected in HCT15 cells.

Growth inhibitory activity of NSAIDs. Growth inhibitory activity of NSAIDs was evaluated on cells allowed to grow for 4 days, which corresponds to the early phase of exponential cell growth. After single exposure to NSAIDs, the number of adherent cells decreased gradually from 24 to 72 h of incubation. The dose-response curve obtained at 24 h demonstrated that NS-398 reduced significantly cell growth from 1 μM, except for HCT15 (Fig. 2). However, the anti-proliferative effect remained moderate with an IC_{50} of

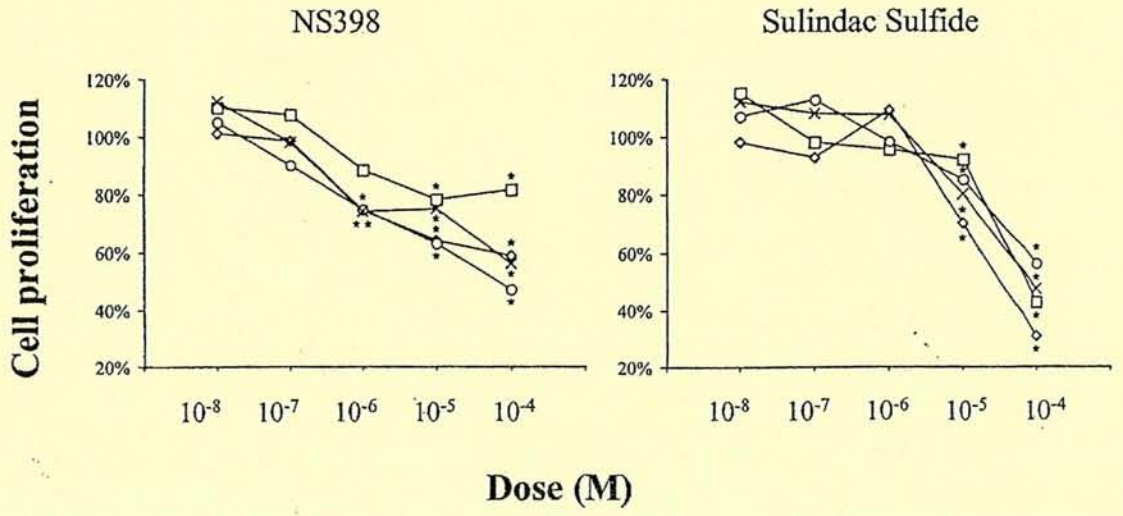


Figure 2. Dose-response study of NSAIDs on human colorectal cancer cell proliferation (○, Caco-2; □, HCT15; ◇, HT29; x, HCT116). Data are expressed as mean percentage of untreated controls after a 24 h exposure to sulindac sulfide or NS-398. *Indicates a significant reduction of cell number ($p<0.05$).

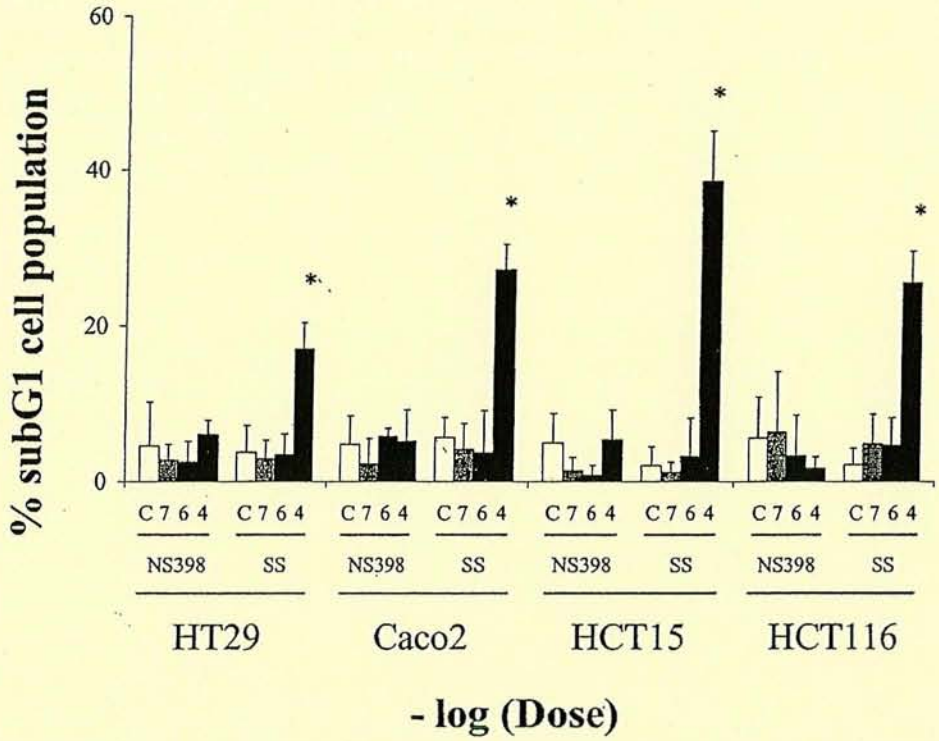


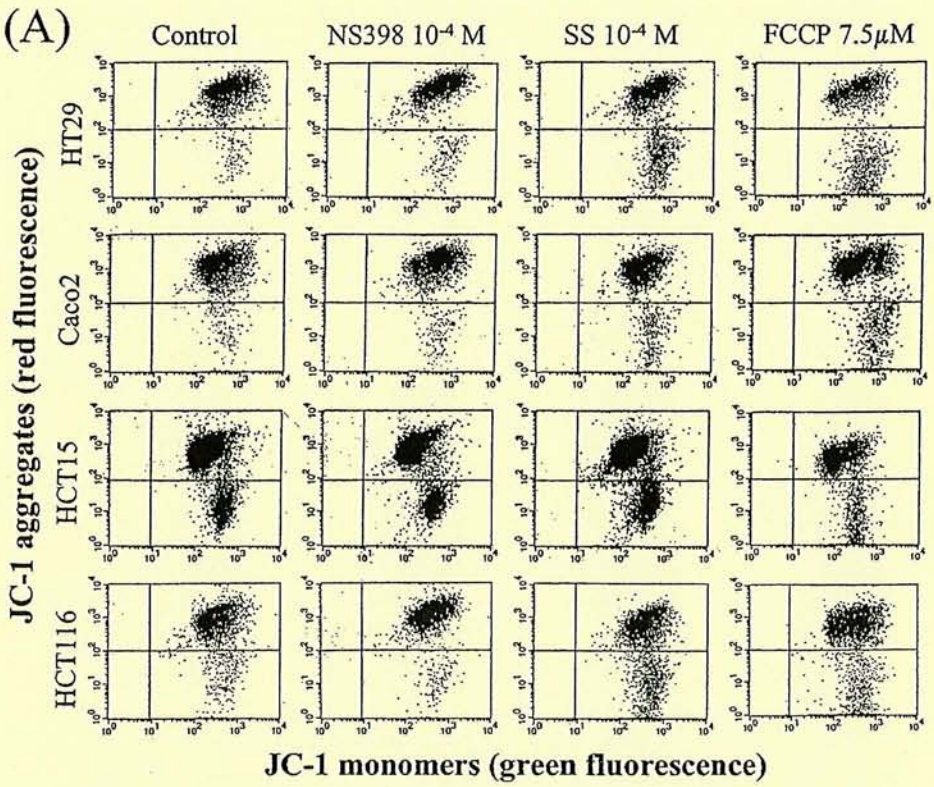
Figure 3. Dose-response study of NSAIDs on apoptosis in human colorectal cancer cells. Data are collected from 3 independent experiments and are expressed as mean percentage ± standard deviation of cells with sub-diploid DNA content (subG$_1$ peak) after 24 h of incubation with sulindac sulfide (SS) or NS-398 (NS398). C, untreated controls; *p<0.05 versus controls.

approximately 70 μM on Caco-2 cells and a maximal inhibition of -44% on HCT116, -41% on HT29 and -18% on HCT15 at 100 μM. In the same conditions, sulindac sulfide inhibited the growth of all cell lines from 10 μM, with IC_{50} values of approximately 33, 75, 170 and 65 μM on HT29, Caco-2, HCT15 and HCT116, respectively. NSAIDs increased the uptake of trypan blue dye in a similar way, indicating that both drugs decreased viable tumor cell number (data not shown).

Effect of NSAIDs on apoptosis. The percentage of subG$_1$ cell population was assessed after 24 h of incubation with NSAIDs. Incubation with NS-398 failed to increase the proportion of cells with subG$_1$ DNA content, whatever the concentration used (Fig. 3). In contrast, sulindac sulfide increased dramatically the percentage of subG$_1$ cell population in all cell lines at 100 μM. No effect was observed at lower concentrations of this NSAID. Preliminary experiment indicated that 100 μM NSAIDs did not increase lactate deshydrogenase release in cell culture supernatants, thus confirming that the concentrations used were not overlapping necrosis (data not shown).

Effects of NSAIDs on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). In all experimental conditions, green fluorescence was not modified (Fig. 4A), suggesting a constant mitochondrial mass. However, monitoring of red fluorescence allowed to distinguish high red fluorescence cells, corresponding to a high $\Delta\Psi_m$ population referred as Upper Right in Fig. 4B, and low red fluorescence cells, corresponding to a low $\Delta\Psi_m$ population referred as Low Right in the same figure. Controls are mainly composed of high $\Delta\Psi_m$ cells, representing 86-95% of total population depending of the cell line (Fig. 4B). Incubation with NS-398 failed to modify the proportion of high and low $\Delta\Psi_m$ populations, even at 100 μM. By contrast, exposure to 100 μM sulindac sulfide induced a marked drop in red fluorescence, so that high $\Delta\Psi_m$ cells accounted only for 76 to 87% of total population (Fig. 4B), with a corresponding increase in the low $\Delta\Psi_m$ cell population. Lower concentrations of sulindac sulfide were ineffective, indicating that high dose of sulindac sulfide, but not of NS-398, produced a prompt dissipation of $\Delta\Psi_m$ in our colorectal cancer cell lines. In these experimental conditions, 7.5 μM FCCP increased the low $\Delta\Psi_m$ cell population (Fig. 4A) to levels close (HCT15, HCT116) or superior (HT29, Caco-2) to those obtained with 100 μM sulindac sulfide (Fig. 4B). Pretreatment with 1 μM CsA prevented partly the depolarizing effect of high dose sulindac sulfide in HT29, HCT15 and HCT116 cells, since the Low Right values with JC-1 decreased from 23.1±8.4 to 10.3±2.0, 24.1±3.1 to 15.0±1.2 and 18.0±4.0 to 12.9±0.7, respectively (Fig. 5). No significant reduction was observed for Caco-2. In all cell lines, CsA was ineffective against dissipation of $\Delta\Psi_m$ induced by FCCP (Fig. 5).

Cytosolic release of Smac/DIABLO by NSAIDs. As shown in Fig. 6, 100 μM sulindac sulfide induced the cytosolic release of Smac/DIABLO in all cell lines, as was the case for 7.5 μM FCCP, although a weak signal in Caco-2 cells. In these



(B)

UPPER RIGHT

	Control	NS 10-7	NS 10-6	NS 10-4	SS 10-7	SS 10-6	SS 10-4	FCCP 7.5
HT29	95.2 ± 1.6	94.1 ± 2.5	94.3 ± 1.9	94.7 ± 2.1	93.5 ± 2.1	92.4 ± 3.6	79.3 ± 7.3 *	61.5 ± 6.8 *
Caco2	93.2 ± 3.6	91.7 ± 2.4	93.1 ± 3.1	93.5 ± 1.6	92.4 ± 2.7	93.0 ± 2.0	87.2 ± 2.4 *	74.8 ± 3.6 *
HCT15	85.5 ± 3.2	83.8 ± 4.1	82.0 ± 5.8	85.4 ± 3.4	83.8 ± 2.0	78.2 ± 3.7	76.3 ± 3.3 *	74.2 ± 1.1 *
HCT116	91.5 ± 3.0	90.9 ± 3.7	90.2 ± 4.4	90.1 ± 5.7	88.8 ± 5.7	90.4 ± 3.1	78.1 ± 7.9 *	73.5 ± 1.0 *

LOW RIGHT

	Control	NS 10-7	NS 10-6	NS 10-4	SS 10-7	SS 10-6	SS 10-4	FCCP 7.5
HT29	4.6 ± 1.5	5.7 ± 2.4	5.4 ± 1.8	5.0 ± 2.2	6.1 ± 2.2	7.3 ± 3.5	20.3 ± 7.4 *	38.7 ± 8.7 *
Caco2	6.2 ± 3.8	7.6 ± 3.1	6.4 ± 3.4	6.0 ± 1.5	6.9 ± 3.0	6.3 ± 2.1	12.1 ± 2.9 *	23.9 ± 6.4 *
HCT15	14.1 ± 3.5	15.7 ± 4.5	17.5 ± 6.0	14.2 ± 3.8	15.9 ± 1.6	21.4 ± 4.1 *	22.7 ± 4.7 *	25.4 ± 2.5 *
HCT116	7.3 ± 4.0	7.5 ± 4.9	8.6 ± 3.6	9.0 ± 6.1	10.6 ± 6.2	8.9 ± 3.9	20.4 ± 7.2 *	25.7 ± 2.6 *

Figure 4. Effect of NSAIDs on mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) in human colorectal cancer cells. (A), Representative scanning of JC-1 fluorescence in controls and cells incubated for 18 h with NSAIDs or FCCP. (B), Estimation of JC-1 subpopulations according to the red fluorescence. Upper right (UR) refers to high red fluorescence cells (high $\Delta\Psi_m$), Low right (LR) to low red fluorescence cells (low $\Delta\Psi_m$). Data are collected from 3 independent experiments and are expressed as mean percentage ± standard deviation of cells in the corresponding window. C, untreated controls; NS, NS-398; SS, sulindac sulfide; *p<0.05 versus controls.

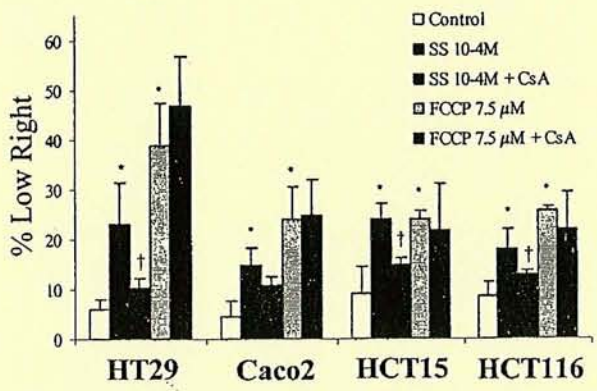


Figure 5. Effect of cyclosporin A (CsA, 1 μM) pre-treatment on $\Delta\Psi_m$ dissipation induced by sulindac sulfide (SS) or FCCP in human colorectal cancer cells. *Indicates a significant difference versus controls (p<0.05). †Indicates a significant effect of CsA versus uncouplers (p<0.05).

experimental conditions, Smac/DIABLO release was not enhanced by 100 μM NS-398. Pretreatment with 1 μM CsA reduced the release of Smac/DIABLO induced by both depolarizing agents in HT29 cells, and by sulindac sulfide in HCT15 and HCT116 (Fig. 6). No preventive effect was observed in Caco-2 cell line.

Effect of mitochondrial permeabilization on apoptosis. In cancer cells exposed to 7.5 μM FCCP for 24 h, no increase in the percentage of subG$_1$ cell population was observed (Table I). Similar lack of efficacy was observed with higher dosage (10 and 20 μM) of FCCP (data not shown). When cells exposed to sulindac sulfide were pretreated with 1 μM CsA, which prevented dissipation of $\Delta\Psi_m$ in three of our cell lines, a partial but significant reduction of cells with subG$_1$ DNA content was noted for HT29 and HCT116 (Table I).

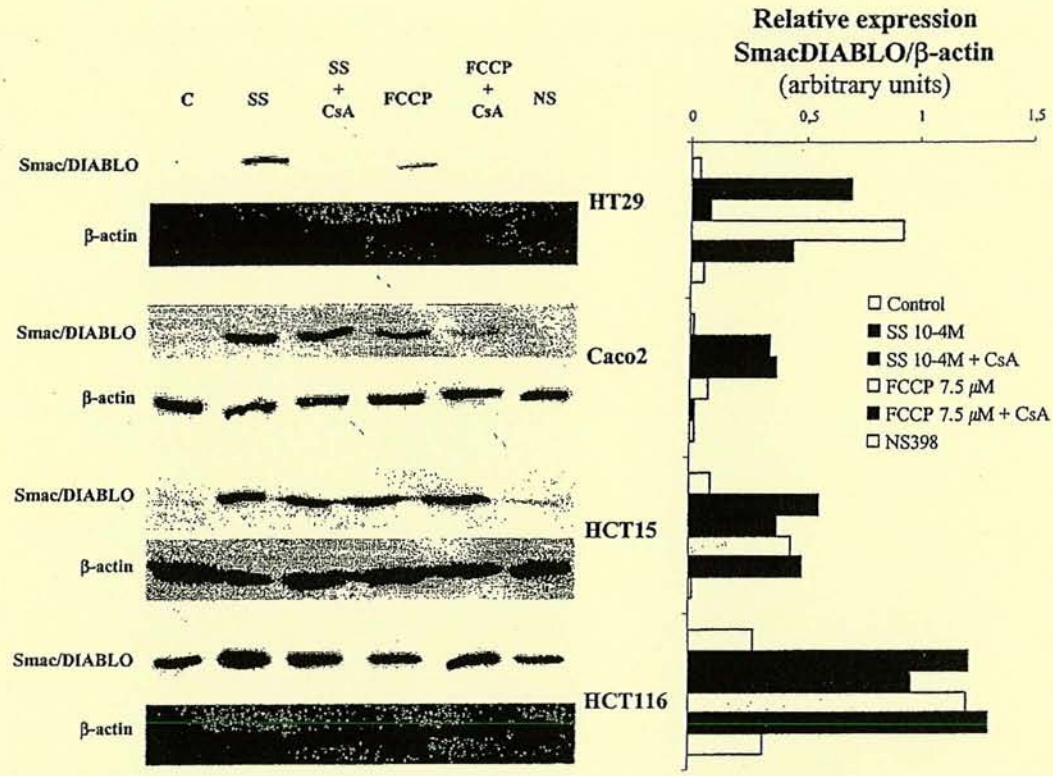


Figure 6. Cytosolic release of Smac/DIABLO in human colorectal cancer cells incubated with NSAIDs or FCCP for 18 h, with or without pre-treatment by cyclosporin A (CsA, 1 μM). Densitometric values were determined in regard to the ß-actin content on cytosolic fraction of cell homogenates as described in Materials and methods. C, untreated controls; NS, 10^{-4}M NS-398; SS, 10^{-4}M sulindac sulfide; FCCP, 7.5 μM FCCP.

Table I. Effect of cyclosporin A (CsA, 1 μM) pre-treatment on induction of apoptosis by sulindac sulfide or FCCP in human colorectal cancer cells.[a]

Cells	Control	SS 10^{-4}M	SS 10^{-4} M + CsA	FCCP 7.5 μM	FCCP 7.5 μM + CsA
HT29	3.3±0.8	20.7±2.0[b]	14.1±2.6[b,c]	3.4±1.1	3.7±0.2
Caco-2	4.5±1.3	26.8±8.2[b]	21.7±5.8[b]	7.9±2.1	4.5±1.2
HCT15	2.7±1.9	37.8±9.3[b]	32.1±7.5[b]	6.4±1.1	3.3±1.8
HCT116	4.1±1.7	26.1±1.5[b]	17.0±4.3[b,c]	4.2±3.2	4.7±2.0

[a]Data are collected from 3 independent experiments and are expressed as mean percentage ± standard deviation of cells with sub-diploid DNA content ($subG_1$ peak) after 24 h of incubation with NSAIDs or FCCP. Control, untreated controls; SS, sulindac sulfide. [b]Indicates a significant difference versus controls ($p<0.05$). [c]Indicates a significant effect of CsA versus uncouplers ($p<0.05$).

Discussion

Western blot analysis confirmed that HT29 and Caco-2 expressed COX-1 and COX-2 proteins, whereas HCT15 was negative for both isoenzymes. As the cell lines were adapted to a low concentration of fetal calf serum into culture medium, expression of COX-2 was likely constitutive in HT29 and Caco-2 rather than secondary to induction by growth factors. The lack of expression of COX isoenzymes in HCT15 confirmed that it is a unique tool to highlight COX-independent mechanisms of NSAIDs (18), although this might depend on experimental conditions (19). Same variation may also occur for HCT116, which expressed COX-1 and COX-2 in our culture system but has been used as a COX-2 negative cell line (10,11). Yet, in a preliminary study of gene regulation, COX-2 was expressed constitutively in this cell line (20).

In our experimental conditions, sulindac sulfide and NS-398 displayed a dose-dependent antiproliferative effect within 24 h, consistently with previous reports (10,11,17). As sulindac sulfide was more potent than NS-398, one may argue that its greatest inhibitory potency could result from a dual COX-1 and COX-2 over a single COX-2 inhibition. However, a careful analysis of the data suggests that inhibition of COX isoenzymes was not sufficient to account for proliferation

blockade by NSAIDs since: inhibition of cell growth occurred at doses exceeding largely those required to inhibit PGE_2 synthesis (21); antiproliferative effect of sulindac sulfide was not lower in HCT15 than in COXs expressing cell lines. Such high concentration of sulindac sulfide is achievable in the colon after repeated oral intake of sulindac (22).

The first striking difference we observed between NSAIDs was their ability to induce apoptosis. In good agreement with previous works, sulindac sulfide promoted apoptosis strongly in colorectal cancer cells (9,17), even in the absence of COXs (18). By contrast, NS-398 lacked any pro-apoptotic effect despite its ability to inhibit cell proliferation, as reported recently in human hepatocellular carcinoma (23). As induction of apoptosis was reported from 75 μM NS-398 in colon cancer cells (19,24), our data cannot be explained by the concentration used. A plausible explanation may be the time chosen to check for apoptosis. Indeed, apoptotic findings which were obvious after 48-96 h (25) of cell incubation with NS-398, failed to be detected at 24 h (21). In addition, the pro-apoptotic effect of NS-398 depended both on the level of COX-2 expression (24) and on culture conditions (26). Our data demonstrate that in colorectal cancer cell lines, the anti-proliferative effect of sulindac sulfide but not of NS-398 was supported mainly by induction of apoptosis, a finding occurring likely independently of COX inhibition.

Uncoupling of oxidative phosphorylation has been investigated as an alternate mechanism of action of NSAIDs with respect to the digestive tract (27), but little is known about its possible contribution to colorectal chemoprevention and apoptosis. Among fluorescent probes able to reflect changes in mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), JC-1 dye is considered to be the most reliable (28). In the present study, we demonstrated that sulindac sulfide induced a loss of $\Delta\Psi_m$ in a COX-independent manner, as was the case for the classical uncoupler FCCP (29). Basically, uncouplers of oxidative phosphorylation can also induce the mitochondrial permeability transition (MPT). This led us to study the consequence of MPT blockade by cyclosporin A on the depolarizing effect of both molecules (30). Dissipation of $\Delta\Psi_m$ induced by sulindac sulfide was significantly reduced by CsA, thereby indicating that opening of MPT pore contributed to uncoupling. This effect may imply the generation of reactive oxygen species (ROS) during mitochondrial respiration, as demonstrated recently for the opening of MPT pore in hepatocytes by the NSAID diclofenac (31,32). Accordingly, sulindac, indomethacin and salicylic acid increased intracellular ROS generation in HT29 colon cancer cells (33,34). In addition, sulindac sulfide displayed minor scavenging properties over sulindac in models of chemically-induced ROS production (35), whereas it sensitized HT29 cells to deoxycholate-induced apoptosis without reducing peroxynitrite formation (36). Thus, alteration of cellular ROS metabolism may participate in MPT induced by sulindac sulfide in our model with a possible contribution of Bax protein (37). In contrast, the depolarizing effect of the protonophore FCCP, which is known to dissipate the proton gradient across the inner mitochondrial membrane (38), was not affected by CsA pre-treatment. This suggests that FCCP induced depolarization and possibly calcium-release in a CsA-insensitive manner, a mechanism referred previously as non-classic MPT (39), or that it overwhelmed the inhibitory effect of CsA on pore opening (40). As expected by its lack of any ionisable moiety, NS-398 failed to affect the $\Delta\Psi_m$, even at the highest concentration tested.

To investigate a possible link between MPT pore opening and occurrence of apoptosis in our cancer cells, we searched for the cytosolic release of Smac/DIABLO protein. When released from mitochondrial intermembrane in its mature form, Smac/DIABLO inhibits the interaction between BIR3 and caspase-9 and linker-BIR2 and capsase-3 or -7, thereby relieving the inhibitory effects of the XIAP on caspases (41). Consistent with its membrane processing secondary to a decrease in $\Delta\Psi_m$ (42), Smac/DIABLO was detected in cytosolic fraction of cells exposed to sulindac sulfide or FCCP, but not to NS-398. Moreover, CsA decreased Smac/DIABLO release induced by sulindac sulfide, except in Caco-2 cells, but was ineffective against that induced by FCCP. Taken together, these data suggest that dissipation of $\Delta\Psi_m$ induced by uncouplers was associated with opening of MPT pore and subsequent mitochondrial permeabilization, resulting in Smac/DIABLO release. This is the first demonstration of such mechanism in response to NSAIDs or FCCP in colon cancer cells, although similar cascade was reported recently with the mitochondrial uncoupler rottlerin (42).

In many cell types, the cytosolic release of Smac/DIABLO preceded caspases activation and biological hallmarks of apoptosis (43). In our experimental conditions, dissipation of $\Delta\Psi_m$ and Smac/DIABLO release occurred before DNA fragmentation in response to 100 μM sulindac sulfide. However, the present data do not support mitochondrial impairment as a major trigger of apoptosis in our cell lines. Firstly, the prevention of mitochondrial permeabilization by 1 μM CsA provided a moderate reduction of apoptosis in response to sulindac sulfide (from 16% in HCT15 to 41% in HCT116). Secondly, FCCP failed to induce apoptosis despite a strong depolarizing effect in all colorectal cell lines. In our experimental conditions (5% FCS), this lack of efficacy is unlikely to result from inactivation of FCCP by binding to proteins since induction of apoptosis was shown to be delayed rather than suppressed by higher concentration of FCS in culture medium (44). As similar concentration of FCCP was shown to induce apoptosis in cells of lymphoid, myeloid or neuronal origin (44), our results suggest that colorectal cells may have developed protective mechanisms or that apoptosis is influenced differently by MPT depending on its sensitivity to CsA. Indeed, despite inducing a collapse of $\Delta\Psi_m$, FCCP was unable to induce Bax translocation if ATP was not maintained at a sufficient intracellular level (45). Moreover, the uncoupler rottlerin was rather able to sensitize colorectal cells to apoptotic triggers than to induce apoptosis by itself (42). Thirdly, the release of Smac/DIABLO was comparable for sulindac sulfide and FCCP despite a striking difference in their ability to induce apoptosis. This result demonstrates that Smac/DIABLO does not play an essential role in the apoptotic response of colorectal cancer cells to uncouplers and that additional mechanisms exist for sulindac sulfide. This is further supported by the inability of Smac/DIABLO translocation into cytosol to mediate apoptosis in lung carcinoma cells exposed to etoposide (46). Moreover, fibroblasts from Smac/DIABLO-deficient mice responded normally to various

apoptotic stimuli as UV irradiation and exposure to anti-cancer drugs or TNF (47).

In conclusion, the present study demonstrates that the stronger antiproliferative effect of sulindac sulfide, an acidic NSAID, over NS-398, a non-acidic tricyclic, was supported by induction of apoptosis in human colorectal cancer cells independently from COX expression. Despite the ability of sulindac sulfide to behave as a protonophoric uncoupler with subsequent collapse of $\Delta\Psi_m$, CsA-sensitive opening of mitochondrial permeability transition pore contributed only marginally to its pro-apoptotic effect. As demonstrated with FCCP, Smac/DIABLO release correlated well with mitochondrial permeabilization by uncouplers but was not predictive of apoptosis induction. Further experiments are needed to clarify the contribution of pro-apoptotic proteins known to interact with MPT pore in the apoptotic response to sulindac sulfide in colorectal cancer cells.

Acknowledgements

This work was supported by Grant No. 6063 from the Association pour la Recherche sur le Cancer, and by La Ligue contre le Cancer (Comité de Meurthe et Moselle).

References

1. Ricchi P, Zarrilli R, Di Palma A and Acquaviva AM: Non-steroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. Br J Cancer 88: 803-807, 2003.
2. Vane J: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. Nature 231: 232-235, 1971.
3. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S and DuBois RN: Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology 107: 1183-1188, 1994.
4. Pugh S and Thomas GAO: Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. Gut 35: 675-678, 1994.
5. Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ and Murray FE: The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. JAMA 282: 1254-1257, 1999.
6. Tsujii M and DuBois RN: Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endo-peroxide synthase 2. Cell 83: 493-501, 1995.
7. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, *et al*: Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). Cell 87: 803-809, 1996.
8. Thun MJ, Henley SJ and Patrono C: Non-steroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic and clinical issues. J Natl Cancer Inst 94: 252-266, 2002.
9. Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL and Rigas B: Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. J Clin Invest 96: 491-503, 1995.
10. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, *et al*: Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. J Clin Invest 99: 2254-2259, 1997.
11. Smith ML, Hawcroft G and Hull MA: The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action. Eur J Cancer 36: 664-674, 2000.
12. Pasricha PJ, Bedi A, O'Connor K, *et al*: The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial adenomatous polyposis. Gastroenterology 109: 994-998, 1995.
13. Gupta RA and Dubois RN: Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. Nat Rev Cancer 1: 11-21, 2001.
14. Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW: Mechanisms underlying non-steroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 95: 681-686, 1998.
15. Qiao L, Kozoni V, Tsioulias GJ, Koutsos MI, Hanif R, Shiff SJ and Rigas B: Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes *in vivo*. Biochim Biophys Acta 1258: 215-223, 1995.
16. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD and DuBois RN: Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. Cancer Res 58: 362-366, 1998.
17. Piazza GA, Rahm AL, Krutzsch M, *et al*: Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. Cancer Res 55: 3110-3116, 1995.
18. Hanif R, Pittas A, Feng Y, *et al*: Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. Biochem Pharmacol 52: 237-245, 1996.
19. Li M, Wu X and Xu XC: Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cyto-chrome c-dependent pathway. Clin Cancer Res 7: 1010-1016, 2001.
20. Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, *et al*: Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. Proc Natl Acad Sci USA 93: 4816-4820, 1996.
21. Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S and Kawai S: Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells. FEBS Lett 531: 278-284, 2002.
22. Duggan DE, Hooke KF and Hwang SS: Kinetics of the tissue distributions of sulindac and metabolites. Relevance to sites and rates of bioactivation. Drug Metab Dispos 8: 241-246, 1980.
23. Cheng J, Imanishi H, Amuro Y and Hada T: NS-398, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, inhibited cell growth and induced cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cell lines. Int J Cancer 99: 755-761, 2002.
24. Elder DJ, Halton DE, Hague A and Paraskeva C: Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective non-steroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. Clin Cancer Res 3: 1679-1683, 1997.
25. Crew TE, Elder DJE and Paraskeva C: A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal antiinflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate. Carcinogenesis 21: 69-77, 2000.
26. Chang HC and Weng CF: Cyclooxygenase-2 level and culture conditions influence NS398-induced apoptosis and caspase activation in lung cancer cells. Oncol Rep 8: 1321-1325, 2001.
27. Mahmud T, Somasundaram S, Sigthorsson G, *et al*: Enantiomers of flurbiprofen can distinguish key pathophysio-logical steps of NSAID enteropathy in the rat. Gut 43: 775-782, 1998.
28. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C and Cossarizza A: JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. FEBS Lett 411: 77-82, 1997.
29. Moreno-Sanchez R, Bravo C, Vasquez C, Ayala G, Silveira LH and Martinez-Lavin M: Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by non-steroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells and whole heart. Biochem Pharmacol 57: 743-752, 1999.
30. Broekemeier KM, Dempsey ME and Pfeiffer DR: Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. J Biol Chem 264: 7826-7830, 1989.
31. Masubuchi Y, Nakayama S and Horie T: Role of mitochondrial permeability transition in diclofenac-induced hepatocyte injury in rats. Hepatology 35: 544-551, 2002.
32. Gomez-Lechon MJ, Ponsoda X, O'Çonnor E, Donato T, Castell JV and Jover R: Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. Biochem Pharmacol 66: 2155-2167, 2003.
33. Tatebe S, Sinicrope FA and Kuo MT: Induction of multidrug resistance proteins MRP1 and MRP3 and gamma-glutamyl-cysteine synthetase gene expression by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human colon cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 290: 1427-1433, 2002.
34. Giardina C and Inan MS: Non-steroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells. Biochim Biophys Acta 1401: 277-288, 1998.

35. Fernandes E, Toste SA, Lima JL and Reis S: The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. Free Radic Biol Med 35: 1008-1017, 2003.
36. Washo-Stultz D, Crowley-Weber CL, Dvorakova K, *et al*: Role of mitochondrial complexes I and II, reactive oxygen species and arachidonic acid metabolism in deoxycholate-induced apoptosis. Cancer Lett 177: 129-144, 2002.
37. Buccellato LJ, Tso M, Akinci OI, Chandel NS and Budinger GR: Reactive oxygen species are required for hyperoxia-induced Bax activation and cell death in alveolar epithelial cells. J Biol Chem 279: 6753-6760, 2004.
38. Gunter TE and Pfeiffer DR: Mechanisms by which mitochondria transport calcium. Am J Physiol 258: C755-C786, 1990.
39. Kanno T, Fujita H, Muranaka S, *et al*: Mitochondrial swelling and cytochrome c release: sensitivity to cyclosporin A and calcium. Physiol Chem Phys Med NMR 34: 91-102, 2002.
40. Brustovetsky N and Dubinsky JM: Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. J Neurosci 20: 8229-8237, 2000.
41. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X and Shi Y: Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. Nature 406: 855-862, 2000.
42. Tillman DM, Izeradjene K, Szucs KS, Douglas L and Houghton JA: Rottlerin sensitizes colon carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis via uncoupling of the mitochondria independent of protein kinase C. Cancer Res 63: 5118-5125, 2003.
43. Ferri KF and Kroemer G: Mitochondria - the suicide organelles. Bioessays 23: 111-115, 2001.
44. Stoetzer OJ, Pogrebniak A, Pelka-Fleischer R, Hasmann M, Hiddemann W and Nuessler V: Modulation of apoptosis by mitochondrial uncouplers: apoptosis-delaying features despite intrinsic cytotoxicity. Biochem Pharmacol 63: 471-483, 2002.
45. Smaili SS, Hsu YT, Sanders KM, Russell JT and Youle RJ: Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. Cell Death Differ 8: 909-920, 2001.
46. Bartling B, Lewensohn R and Zhivotovsky B: Endogenously released Smac is insufficient to mediate cell death of human lung carcinoma in response to etoposide. Exp Cell Res 298: 83-95, 2004.
47. Okada H, Suh WK, Jin J, *et al*: Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. Mol Cell Biol 22: 3509-3517, 2002.

Prénom, Nom : **Mikaël DAOUPHARS**

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie - Santé - Environnement

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER N° 883

Nancy, le 23 Novembre 2004

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I
LE PRESIDENT

Jean-Pierre FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1
24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex - Tél. 03 83 85 48 00 - Fax 03 83 85 48 48
Adresse électronique : _____ @uhp-nancy.fr

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1 (Pharmacie)

Mention : Sciences du Médicament

Sujet : Mécanismes d'action des AINS en relation avec la prolifération cellulaire et l'apoptose

Prénom et Nom : Mikaël DAOUPHARS

Laboratoire et contact : UMR CNRS – UHP 7561 Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires
Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy

Directeur de thèse : Professeur Jean-Yves JOUZEAU

Date et lieu de soutenance : 08 novembre 2004, Faculté de Médecine

Jury : Pr B Chauffert, rapporteur, Dijon
Pr G Thiéfin, rapporteur, Reims
Pr J-L Merlin, Nancy
Pr J-Y Jouzeau, Nancy

RESUME

Les études épidémiologiques ont suggéré que la consommation régulière d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), et plus particulièrement celle d'aspirine ou de sulindac, serait capable de diminuer le nombre de polypes chez les patients porteurs de polypose familiale. Elle serait également associée à une incidence moitié moindre du cancer colorectal, y compris en termes de mortalité. L'étude de biopsies digestives a montré que les tissus tumoraux produisent des quantités exagérées de prostaglandines E2 par rapport aux tissus sains et que ceci est dû à une expression anormalement élevée de COX-2, tant au niveau de la protéine que de ses messagers. De plus, l'activation d'oncogènes et la transformation cellulaire sont étroitement associées à l'expression de COX-2. Ainsi, même si l'action des AINS pourrait ne pas être univoque (blocage de l'activation métabolique de carcinogènes par les COX par exemple), l'inhibition de COX-2 pourrait en être un élément essentiel, d'autant que la transfection de COX-2 dans les cellules épithéliales digestives s'accompagne de nombreuses modifications fonctionnelles dont une résistance à la mort cellulaire programmée (apoptose). La chimioprévention du cancer colorectal par les AINS semble donc trouver des bases scientifiques indéniables et a bénéficié d'un nouvel essor avec le développement d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 doués d'une tolérance digestive améliorée, davantage compatible avec un usage prolongé.

Le premier objectif de ce travail était de comparer les effets sur la prolifération cellulaire et l'apoptose, d'AINS ayant des profils de sélectivité différents vis-à-vis des isoenzymes de la COX, sur des lignées humaines de cancer colorectal, elles-mêmes différentes par leur statut COX. Les quatre lignées humaines de cancer colorectal (HT29, Caco-2, HCT15, HCT116) ont été caractérisées en termes de différenciation et de prolifération cellulaires, d'expression des COXs. Les effets d'AINS classiques (aspirine, indométacine, kétoprofène, sulfure de sulindac) et d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 (célécoxib, NS-398) ont ensuite été étudiés vis-à-vis de la prolifération, du cycle cellulaire et de l'apoptose. Cette étude a montré que les AINS, à l'exception de l'aspirine et du kétoprofène, inhibaient la croissance des différentes lignées cellulaires à une concentration supérieure ou égale à 10^{-4}M. Lorsqu'il existait, cet effet antiprolifératif était généralement associé à un blocage du cycle cellulaire en phase G_1, en particulier pour le sulfure de sulindac et le NS-398. Cependant, à cette concentration (10^{-4}M), seul le sulfure de sulindac favorisait l'apoptose dans toutes les lignées colorectales humaines, y compris la lignée HCT15 n'exprimant pas les COXs.

Le second objectif de ce travail était de mettre en évidence les mécanismes impliqués, d'autant que les effets observés sur le cycle cellulaire, d'une part, et sur l'apoptose, d'autre part, suggéraient respectivement la participation de mécanismes COX-dépendants et COX-indépendants. Compte tenu de la différence de structure chimique entre le sulfure de sulindac (AINS carboxylique) et le NS-398 (arylsulfonamide), et comme leurs effets antiprolifératifs n'étaient observés qu'à des concentrations nettement supérieures à celles requises pour l'inhibition de la synthèse des prostaglandines, nous avons recherché la contribution éventuelle d'un découplage de la phosphorylation oxydative dans ce processus. Dans nos conditions expérimentales, le sulfure de sulindac, mais pas le NS-398, provoquait une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial $\Delta\psi m$, et ce, indépendamment de l'expression des COXs. Cet effet découpleur précédait la libération de protéines mitochondriales pro-apoptotiques (cytochrome *c*, Smac/DIABLO), ainsi que l'activation des caspases 3 ou 9. La préincubation des cellules par la ciclosporine A inhibait la libération de Smac/DIABLO induite par le sulfure de sulindac, suggérant l'intervention du complexe de perméabilisation de pore dans le relarguage de protéines mitochondriales pro-apoptotiques. Le découplage de la phosphorylation oxydative n'était cependant pas suffisant pour expliquer la totalité de l'effet du sulfure de sulindac puisque le FCCP (découpleur de référence) n'induisait pas d'apoptose malgré la chute de $\Delta\psi m$ et la libération mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques.

MOTS CLES

Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien, Apoptose, Colon, Cyclooxygénase, Découplage, Mitochondrie, Prolifération