

Exploration in vitro et ex vivo du pouvoir inhibiteur des anti-inflammatoires non stéroïdiens vis-à-vis des iso-enzymes de la cyclooxygénase

Hubert Blain

▶ **To cite this version:**

Hubert Blain. Exploration in vitro et ex vivo du pouvoir inhibiteur des anti-inflammatoires non stéroïdiens vis-à-vis des iso-enzymes de la cyclooxygénase. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2002. Français. NNT : 2002NAN11304 . tel-01754434

HAL Id: tel-01754434
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754434

Submitted on 30 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

N° attribué par la bibliothèque |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I - 2002

FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ET ENVIRONNEMENT »

THESE

SCD-UHP - NANCY 1 BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement

le 25 Février 2002

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

Discipline: Sciences du Médicament

par

Hubert BLAIN

Exploration *in vitro* et *ex vivo* du pouvoir inhibiteur des anti-inflammatoires non stéroïdiens vis-à-vis des iso-enzymes de la cyclooxygénase

Jury

Juges:

Patrick Netter (Professeur) (Nancy)
Claude Jeandel (Professeur) (Montpellier)
Jean-Yves Jouzeau (Maître de Conférences) (Nancy)

Rapporteurs:

Jean-Pierre Michel (Professeur) (Genève)
François Piette (Professeur) (Paris)

Remerciements

Je tiens à remercier les Professeurs Patrick Netter et Claude Jeandel pour la confiance et le soutien qu'ils m'ont accordés au cours de l'élaboration de ce travail.

Un grand merci amical à Jean-Yves Jouzeau, sans qui ce travail n'aurait pu être finalisé, pour ses conseils et son aide plus que précieux.

Un grand merci à Emmanuelle Nédélec, pour le temps passé à m'enseigner les dosages par ELISA, la PCR et l'extraction protéique.

Un grand merci à Cécile Guillaume pour son aide précieuse et souriante, pour l'étude clinique et les dosages de prostaglandines et des AINS.

Un grand merci aux infirmières du Service de Rhumatologie de Brabois et de Mademoiselle Groussin pour leur aide précieuse à la collection des prélèvements.

Un grand merci à madame Lapicque pour l'aide apportée à la modélisation des courbes d'inhibition et à l'analyse statistique de la prédiction de ces courbes.

Un grand merci aux 24 volontaires de cette étude, qui ont rempli leur rôle avec beaucoup de sérieux et de décontraction.

Un grand merci à tout le personnel du Service de Médecine B, pour leur soutien pendant l'étude et à toutes les personnes de Nancy qui ont contribué de plus ou moins loin au bon déroulement de ce travail.

A ma Famille et à mes amis, pour leur soutien et leur confiance, ce travail vous est dédié.

SCD-UHP - NANCY 1 BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION 6

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 10

II.1. Rappels sur les eicosanoïdes 10

II.1.1. Ancienne vision de la biosynthèse des eicosanoïdes

II.1.2. Propriétés comparées de COX-1 et COX-2 11

II.1.2.a. Principales caractéristiques structurales des COXs 11

II.1.2.b. Principales caractéristiques fonctionnelles des COXs 14

II.1.3. Nouvelle vision de la biosynthèse des eicosanoïdes 20

II.2. Classification des AINS selon leur sélectivité d'inhibition sur les COXs 21

II.2.1. Critères enzymatiques ou biochimiques 22

II.2.2. Critères de pharmacologie expérimentale (sélectivité tissulaire) 27

II.2.3. Critères de pharmacologie clinique (sélectivité *ex vivo*) 27

II.2.4. Critères cliniques (sélectivité *in vivo*) 28

II.2.5 Nouvelle classification des AINS 29

II.3. Pharmacologie clinique d'inhibiteurs de COXs à tolérance digestive améliorée 30

II.3.1. Inhibiteurs préférentiels de COX-2 30

II.3.1.a. Méloxicam (MOBIC®) 30

II.3.1.b. Nimésulide (NEXEN®) 31

II.3.2. Inhibiteurs sélectifs de COX-2 commercialisés 31

II.3.2.a. Rofécoxib (VIOXX®) 31

II.3.2.b Célécoxib (CELEBREX®) 35

II.3.3. Cas pariculier de la nabumétone 38

II.3.4. Inhibiteurs de COX-2 en développement 38

II.3.4.a. Etoricoxib (ARCOXIA®) 38

II.3.4.b. Valdécoxib (BEXTRA®) – Parécoxib 39

II.4. Indications et perspectives thérapeutiques des inhibiteurs sélectifs de COX-2 41

II.4.1. Rhumatologie et prise en charge de la douleur 41

II.4.2. Prévention et traitement des cancers 44

II.4.2.a. Adénome et cancer colorectal 44

II.4.2.b. Autres cancers 45

II.4.2.c. Mécanismes proposés 46

II.4.3. Alzheimer et pathologies du système nerveux central et périphérique 47

II.4.3.a.Pathologies cérérovasculaires ischémiques et hémorragiques 47

II.4.3.b. Démence sénile de type Alzheimer 48

II.4.3.c. Autres pathologies neurologiques 49

II.5. Limitations possibles des inhibiteurs sélectifs de COX-2 50

II.5.1. Risque cardiovasculaire 50

II.5.2. Risque rénal 53

II.5.3. Inflammation colique, cicatrisation d'ulcères gastro-duodénaux et autres risques 56

III. ETUDE EXPERIMENTALE 58

III.1. Contexte général de l'étude 58

III.2. Objectifs 60

III.3. Descriptif de l'étude 61

III.3.1 Caractéristiques de l'essai 61

III.3.2 Nombre de sujets nécessaires 61

III.3.3 Choix et posologie des AINS 62

III.3.4 Choix des fenêtres thérapeutiques 62

III.3.5. Choix des temps de prélèvements sanguins 63

III.4. Sujets et méthodes 65

III.4.1. Critères démographiques et d'inclusion des sujets 65

III.4.2. Etude du pouvoir inhibiteur des AINS *ex vivo* 66

III.4.3. Etude du pouvoir inhibiteur des AINS *in vitro* 70

III.4.4. Analyse statistique 72

II.4.5. Annexes : a. Note d'information destinée aux sujets 74

b. Formulaire de consentement éclairé écrit 77

III.5. Résultats 79

III.5.1. Observance, tolérance 79

III.5.2. Dosage des médicaments-relations sang total/plasma 80

III.5.3. Mesure du pouvoir inhibiteur *in vitro*-courbes dose-réponse 82

III.5.4. Mesure du pouvoir inhibiteur *ex vivo* 85

III.5.5. Valeur prédictive du système *in vitro* vs de l'inhibition mesurée *ex vivo* 89

III.5.6. Pouvoir inhibiteur des AINS sur les eicosanoïdes urinaires 92

III.6. Discussion 94

III.7. Conclusions – perspectives 106

IV. BIBLIOGRAPHIE **108**

SCD-UHP - NANCY 1 BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

I. INTRODUCTION

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 l'automédication. Leurs propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et anti-pyrétiques sont connues depuis la fin du 19ème siècle et expliquent leur large utilisation à visée symptomatique dans des situations diverses telles que l'arthrose, les rhumatismes inflammatoires, les douleurs dentaires et les dysménorrhées en particulier. Certains AINS, et tout particulièrement l'aspirine, ont également des propriétés inhibitrices de l'agrégation plaquettaire qui en font un des traitements préventifs de la thrombose artérielle coronaire, cérébrale et périphérique.

Les AINS doivent cependant être considérés comme une arme à double tranchant [132], puisqu'ils représentent une des classes pharmacologiques les plus souvent citées pour leurs effets indésirables, dont certains sont potentiellement graves. Ainsi estime-t-on 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) [10]. Sur le plan individuel, un ulcère peut être objectivé par endoscopie chez 10 à 20% des sujets consommant un AINS au long cours [262]. Trente à 40 % des patients sous traitement AINS prolongé feront un effet indésirable digestif sévère (ulcère gastroduodénal), devant faire stopper leur prescription dans plus de 10% des cas. Ainsi estime-t-on aussi que l'incidence annuelle des ulcères compliqués ou non est de 2 à 4%, 1 à 2 % des sujets faisant dans l'année une complication grave (perforation, ulcère creusant, saignement) [75]. Même s'il existe des facteurs de risque bien identifiés (âge avancé, antécédent d'ulcère gastroduodénal, posologie élevée d'AINS, etc...), les effets indésirables digestifs demeurent la principale limitation de l'utilisation courte ou prolongée des AINS classiques en rhumatologie [172].

Les AINS interfèrent en outre avec l'homéostasie rénale, les AINS étant pourvoyeurs d'altération de la fonction rénale chez les sujets présentant un débit sanguin rénal diminué (en particulier en cas de déplétion hydrosodée).

Plus récemment, l'attention s'est portée sur les effets cardiovasculaires des AINS:

Tous les AINS sont responsables d'une augmentation de pression artérielle [161]. Or on sait qu'une augmentation de pression artérielle de 2 mm Hg s'accompagne d'une augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral de 40% et d'infarctus du myocarde de 25% [35, 267].

Si certains AINS tels que l'aspirine, et probablement le flurbiprofène ou le naproxène, présentent des propriétés anti-agrégantes plaquettaires, expliquant que leur consommation au long cours s'accompagne d'une réduction d'incidence d'évènements cardiovasculaires [18, 22], d'autres AINS, tels que le diclofénac ou l'ibuprofène, sont dénués d'effet significatif sur l'agrégation plaquettaire. Plus encore, certaines études émettent l'hypothèse que les nouveaux AINS (célécoxib, rofécoxib) en raison de leur absence d'effet sur l'agrégation plaquettaire et en raison de leur effet inhibiteur sur la synthèse de la prostacycline pourraient s'accompagner d'un risque accru de pathologie ischémique cardiaque chez les sujets présentant des facteurs de risque cardio-vasculaire et ne prenant pas d'anti-agrégant plaquettaire [159].

Plus rarement, les AINS sont responsables de réactions immunoallergiques (par exemple cutanés, hépatiques) ou, plus rarement encore, toxiques (par exemple phototoxicité) [7].

Si les effets souhaités ou indésirables des AINS sont bien connus, ces dernières années ont apporté une véritable révolution en ce qui concerne les connaissances de leurs mécanismes d'action. Ainsi, sait-on maintenant que les AINS se caractérisent et se différencient par des capacités d'inhibition plus ou moins importantes de la production de prostaglandines (PG) *via* l'inhibition, elle aussi plus ou moins importante, de 2 isoformes de cyclooxygénases (COX-1 et COX-2). Parce que les PG produites par COX-1 et les PG produites par COX-2 exercent des actions tantôt physiologiques (homéostasie gastrique, rénale, agrégation plaquettaire pour

COX-1, homéostasie osseuse, utérine et rôle dans la plasticité cérébrale pour COX-2) tantôt pathologiques (rôle majeur dans l'inflammation et la cancérogénèse de COX-2), on comprend mieux maintenant que le pourcentage d'inhibition de l'une et de l'autre isoforme de COX par un AINS permette de prédire, au moins en partie, l'intensité de ses effets souhaités (antalgique, anti-pyrétique, anti-inflammatoire, antiagrégant plaquettaire, anti-tumoral etc.) mais aussi indésirables (digestifs, rénaux et thrombotiques)[207].

C'est dire toute l'importance des outils de mesure de l'inhibition respective des 2 isoformes de COXs par les différents AINS, commercialisés ou en cours de développement. Si les résultats des études *in vitro* sur cultures cellulaires sont peu extrapolables aux conditions de prescription, la méthode dite *sur sang total* a été proposée afin d'estimer la sélectivité sur les 2 COXs des AINS, tant *in vitro* (le sang est mis en contact avec des concentrations croissantes d'AINS, permettant de construire des courbes d'inhibition de la production pendant la coagulation spontanée de TXA_2, reflet de l'inhibition de COX-1 et d'inhibition de la production de PGE_2 par les monocytes circulants stimulés par du lipopolysaccharide, reflet de l'inhibition de COX-2) qu'*ex vivo* (on utilise la même méthode, mais le sang est prélevé à différents moments après prise orale d'AINS). Rapidement, cette méthode relativement simple, puisque nécessitant uniquement des prélèvements sanguins répétés, s'est imposée comme la méthode de référence de la mesure de la sélectivité des COXs, bien que son niveau de précision (variabilité intra- et inter-individuelle) n'ait pas été évalué. De plus, peu d'études ont évalué si le niveau d'inhibition réellement mesuré *ex vivo* à un moment donné (au pic de concentration ou à l'équilibre de concentration de l'AINS en particulier) peut être déduit à partir des courbes d'inhibition *in vitro* et de la concentration plasmatique de l'AINS à cet instant. Ainsi ne sait-on pas actuellement si les mesures sur sang total *in vitro* sont suffisantes pour estimer la sélectivité sur les COXs d'une molécule ou si les mesures d'inhibition *ex vivo*

sont indispensables avant de passer aux phases d'évaluation *in vivo*, animales et humaines d'un AINS en développement.

Dans une première partie, nous présenterons les connaissances anciennes et actuelles concernant la biosynthèse des eicosanoïdes par les COXs et les propriétés respectives de COX-1 et de COX-2 et des prostanoïdes qu'elles produisent. Nous ferons le point sur la nouvelle classification des AINS, qui s'appuie sur le pouvoir inhibiteur sur les COXs évalué sur des critères enzymatiques (sélectivité *in vitro*), de pharmacologie expérimentale (sélectivité tissulaire), de pharmacologie clinique (sélectivité *ex vivo*) et clinique (sélectivité *in vivo*).

Nous illustrerons tout l'intérêt de différencier les AINS en fonction de leur pouvoir inhibiteur sur les COXs en montrant la meilleure tolérance digestive des AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2 (coxibs)(rofécoxib et célécoxib) par rapport aux AINS inhibiteurs préférentiels de COX-2 (méloxicam, nimésulide) et surtout par rapport aux AINS classiques. Nous aborderons le cas particulier de la nabumétone et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 en développement.

Nous aborderons les indications actuelles des coxibs dans les pathologies articulaires aiguës et chroniques et dans la polypose intestinale familiale et leurs indications en développement (cancérologie et maladie d'Alzheimer en particulier), mais insisterons sur les nécessaires précautions d'utilisation chez les sujets insuffisant rénaux ou à risque de bas débit artériel rénal et sur la nécessité d'associer de l'aspirine à ces molécules chez les sujets à risque d'événement cardiovasculaire.

Au vu de cette première partie, montrant tout l'intérêt de l'estimation la plus exacte possible des propriétés inhibititrices sur COX-1 et sur COX-2 des AINS, en ce qui concerne la prédiction des effets cliniques souhaités et indésirables, nous présenterons dans une deuxième partie les résultats de notre travail, visant à:

→ évaluer le niveau de variabilité intra- et interindividuelle de la méthode dite « sur sang total » et sa capacité à différencier le pouvoir inhibiteur sur COX-1 et COX-2 de 3 AINS ayant

des profils d'inhibition des COXs différents dans différents modèles *in vitro* et des propriétés pharmacocinétiques différentes

→ définir si les courbes d'inhibition sur sang total obtenues *in vitro* avec un nombre important de sujets permettent de déduire le pouvoir inhibiteur réellement mesuré *ex vivo* à un moment donné (pic et équilibre de concentration après prise orale de l'AINS) à partir de la concentration plasmatique de l'AINS à ce moment donné.

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Rappel sur les eicosanoïdes

II.1.1 Ancienne vision de la biosynthèse des eicosanoïdes

On sait depuis 1970 que les AINS inhibent la biotransformation en prostaglandine (PG) H2 (PGH2) de l'acide arachidonique (acide gras, issu de la transformation par les s- et c-phospholipases A2 des phospholipides membranaires, polyinsaturé, à 20 carbones, sous forme d'ester en position 2), par une enzyme, la cyclooxygénase (COX) [249]. Cette inhibition rend impossible la transformation de PGH2 en prostanoïdes [prostaglandines primaires (PGD_2, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$), prostacycline (PGI2 et son métabolite stables le 6 KétoPGF$_{1\alpha}$).

Cette « théorie de la COX », qui a valu au Professeur Vane de recevoir le prix Nobel de Médecine en 1982 [168], est une hypothèse cohérente eu égard aux propriétés ambivalentes des PG dans l'organisme. Ainsi, la production exagérée de PG en situation pathologique (les lipides membranaires sont les premiers à être en contact avec un stimulus extracellulaire, qu'il soit bactérien, chimique ou physique par exemple) participe à l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs)[264], alors que sa production basale permet l'homéostasie tissulaire

(gastroduodénale, intestinale, et maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypoperfusion en particulier).

Les PG produites ne peuvent agir que de façon autocrine ou paracrine via des récepteurs membranaires (PGT) ou exercer une action intra-cellulaire en se fixant sur des récepteurs nucléaires (modulation de l'activité PPARγ ou action directe sur l'activité NFκB). Il est à noter que des différences subtiles entre les sujets en ce qui concerne ces récepteurs, pourraient expliquer des prédispositions individuelles à des pathologies inflammatoires et des variations individuelles de réponse aux anti-inflammatoires. Le blocage de ces récepteurs pourrait peut-être constituer une voie de recherche pour de nouveaux anti-inflammatoires [163].

II.1.2 Propriétés comparées de COX-1 et de COX-2

Depuis 1988, de nombreuses études ont permis de démontrer qu'il n'existe pas 1 mais bien 2 isoformes distinctes de COXs [51,108,150,195], codées par des gènes différents [95,265] et dénommées COX-1 et COX-2. COX-1 et COX-2 présentent une grande similitude, ce qui permet de comprendre leur inhibition conjointe par les AINS classiques mais également quelques différences essentielles qui permettent d'expliquer leurs rôles physiopathologiques distincts mais aussi les bases de la sélectivité d'inhibition par les nouveaux AINS.

II.I.2.a. Principales caractéristiques structurales des COXs

Les COX-1 et -2 ont une structure très proche [homologie de séquence en acides aminés de 63 % et un poids moléculaire proche de 71 KDa]. Toutes deux sont des glycoprotéines héminiques retrouvées sous forme de dimères dans les cellules et formées chacune de trois sous-unités indépendantes:

- un domaine EGF-like impliqué dans la liaison entre les monomères,

- un domaine ancré dans le feuillet interne de la membrane et formant l'entrée d'un canal hydrophobe étroit, avec une courbure en épingle à cheveux à son extrémité (cristallographie à rayons X), qui conduit l'acide arachidonique issu des phospholipides membranaires vers le site actif,
- un domaine enzymatique constitué de deux sites adjacents mais spatialement distincts pour les activités dioxygénasique (cyclooxygénase) (formation de PGG2) et peroxydasique (transformation de PGG2 en PGH2: réduction du groupe 15-hydroperoxyl de PGG2 en 15-OH de PGG2) [190].

La comparaison des séquences en acides aminés montre que l'on retrouve les mêmes acides aminés importants pour l'activité dioxygénasique (Arg, Ser, Tyr) dans les 2 isoformes des COXs:

Les AINS inhibent l'activité des COXs en bloquant l'accès du site catalytique à l'acide arachidonique par un mécanisme d'exclusion, en interagissant par leur fonction acide carboxylique avec le groupement guanidinium de l'Arg^{120} [cela a été montré avec l'ibuprofène [190] et avec l'aspirine (acide acétylsalicylique)] de sorte que ces AINS sont maintenus dans le canal hydrophobe. Pour l'aspirine, il existe une acétylation de la Ser^{529} voisine pour COX-1 ou de la Ser^{516} pour COX-2. Dans le cas de l'aspirine, l'acétylation de la Ser^{529} se déroule alors que l'acide acétylsalicylique reste fixé sur l'Arg^{120}, de sorte que l'on comprend mieux désormais pourquoi l'acide salicylique peut se comporter comme un compétiteur vis à vis des effets de l'aspirine. Pour certains AINS carboxyliques, cette interaction avec la COX-1 s'accompagne probablement d'un changement de conformation de l'enzyme [190].

Si les deux sites actifs de COX-1 et COX-2 présentent une grande homologie, ils diffèrent par un acide aminé (Ile en position 523 pour COX-1 et valine en position 509 pour COX-2), dont le rôle est crucial. La valine en position 509 est plus petite que l'isoleucine en position 523

parce qu'elle ne contient qu'un seul groupement méthyl. Cet encombrement plus restreint explique l'existence d'un espace dans la paroi du canal de COX-2, donnant l'accès à une poche latérale (« side pocket »), ce qui n'est pas le cas dans COX-1, puisque l'Ile bouche cet orifice. De cette manière, le site actif de COX-2 est plus « large » que celui de COX-1 et présente une flexibilité moléculaire accrue [77,139].

Cette différence de conformation du site actif explique notamment que l'aspirine (qui acétyle irréversiblement les Ser^{529} et Ser^{516} des sites actifs de COX-1 et de COX-2 respectivement), bloque totalement l'accès de l'acide arachidonique au site actif étroit de la COX-1, alors qu'elle n'inhibe que partiellement l'accès au site actif de COX-2, comme l'atteste la biotransformation en 15-HETE. L'irréversibilité de la liaison de l'aspirine à la Ser^{529} de COX-1 et Ser^{516} de COX-2 et le fait que la plaquette anucléée n'exprime que COX-1 sous-tend l'efficacité clinique de faibles posologies d'aspirine et l'inhibition irréversible de l'agrégation plaquettaire qu'elles provoquent [184]. Ceci explique que bien que l'aspirine ait une demi-vie courte (elle est rapidement métabolisée en salicylate et, en 2 à 3 heures, n'est plus dosable dans le sang), on observe une anti-agrégation longue après une seule prise d'aspirine.

La présence de ce site actif plus large explique en outre que COX-2 est capable d'accueillir un plus grand nombre de substrats (acides gras en C20) que COX-1 et que certains AINS présentant un encombrement stérique important peuvent inhiber COX-2 et pas COX-1. Contrairement à l'aspirine, qui inhibe irréversiblement COX-1, les autres AINS se comportent comme des inhibiteurs compétitifs de l'acide arachidonique, expliquant que la présence d'AINS est capable d'inhiber en partie l'effet anti-agrégant plaquettaire de l'aspirine [23]. De récentes études de structure ont révélé la localisation respective des inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans la poche latérale. Elles ont de plus permis de démontrer que l'interaction sur la poche latérale s'exerce selon un mécanisme réversible ou d'interaction lente (formation d'un complexe avec changement de conformation de l'enzyme).

Cette connaissance maintenant approfondie des différences biochimiques entre les isoformes de COXs a permis à l'équipe de Laurence J. Marnett et Amit S. Kalgutkar de mettre au point une molécule qui appartient au groupe de l'aspirine mais qui présente en plus du groupement acétyl, un groupement soufré, qui rend la molécule capable de bloquer COX-2 de façon sélective et définitive. Cette découverte suggère que l'inhibition de COX-1 et/ou de COX-2 par un AINS ne dépend pas seulement de son encombrement stérique [109]. Plus récemment encore, la même équipe, par la même approche (co-cristallisation et études de mutagénèse dirigée), a démontré qu'il était possible de transformer des AINS non sélectifs des COXs en inhibiteurs sélectifs de COX-2 [acide 5,8,11,14eicosatétraynoïque (ETYA), acide arylacétique, acide fénamique, indométacine, acide méclofénamique) en supprimant leur propriété acide carboxylique (estérification et amidation). Ces dérivés se comportent comme des inhibiteurs lents et à forte liaison sur une nouvelle portion ouverte et apicale du site actif de l'enzyme, ce qui ouvre pour l'industrie pharmaceutique une nouvelle voie de production d'inhibiteurs sélectifs de COX-2.

II.I.2.b. Principales caractéristiques fonctionnelles des COXs

Les principales différences fonctionnelles entre COX-1 et COX-2 sont présentées dans les tableaux 1 et 2.

- **COX-1** est exprimée constitutionnellement et de façon ubiquitaire. Elle exerce un rôle régulateur dans différents processus physiologiques, tels que la cytoprotection gastrique, l'hémostase primaire, l'homéostasie vasculaire ou la régulation rénale de l'équilibre hydrosodé.

→ *Agrégation plaquettaire*: Les plaquettes matures sont des cellules anucléées dont le rôle essentiel est homéostatique par agrégation, en réponse à une lésion artérielle. Les plaquettes produisent alors, à partir de l'acide arachidonique, fourni soit de manière exogène, soit à partir de réserves endogènes [16], du thromboxane A_2 (TXA_2), qui quitte la cellule et induit, *via* son

récepteur spécifique TP, une modification de conformation plaquettaire et une activation de ses propriétés agrégantes ainsi qu'une constriction des cellules musculaires lisses vasculaires [233].

	COX-1	COX-2
Gène	22 kb, chromosome 9 mRNA 2.8 kb	8 kb, chromosome 1 mRNA 4.3 kb (instable)
Localisation	Réticulum endoplasmique (+++) Membrane nucléaire (+)	Réticulum endoplasmique (+) Membrane nucléaire (+++)
Substrats	Acide arachidonique (AA) AA exogène (synthétisé par cPLA2 des cellules voisines)	AA, autres acides gras en C18, 20 AA exogène et endogène (sPLA2 et cPLA2)
Expression	Constitutionnelle, ubiquitaire A niveau constant	Constitutionnelle dans le cerveau, prostate, rein Inductible en 1 à 3 h dans tous les tissus par IL-1, IL-2, TNFα, les facteurs de croissance (EGF, FSH) et le LPS bactérien Inhibition par les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13)
Effet des glucocorticoïdes	Peu ou pas d'inhibition directe de l'activité enzymatique	Réduction de la transcription Blocage de la traduction de la protéine inductible
Effet de l'aspirine	Inhibition totale	Production de 15-R-HETE

Tableau 1. Principales différences fonctionnelles entre les 2 isoformes de COX

→ *Parturition*: Les premières études ont démontré que les souris déficientes en COX-1 ont un développement fœtal normal [133], produisent des portées de taille normale [127] mais ont des difficultés de parturition [127]. En effet, l'initiation de la parturition est retardée chez ces souris. D'autre part, l'administration de $PGF_{2\alpha}$ induit le travail, suggérant que COX-1 est la source essentielle de $PGF_{2\alpha}$ (Gross-1998). Cependant, un traitement par lipopolysaccharide (LPS), un composant de l'enveloppe bactérienne, qui induit les réponses cellulaires associées à la septicémie, induit COX-2 et entraîne la parturition, même chez les souris déficientes en COX-1. L'utilisation de SC-236, un inhibiteur sélectif de COX-2, bloque également l'initiation de la parturition chez ces souris traitées par le LPS. Ces données suggèrent donc que sous

certaines conditions, COX-2 peut aussi produire la $PGF_{2\alpha}$ nécessaire à l'initiation de la parturition [85].

→ Si, nous le verrons, COX-2 joue un rôle important dans la cancérogénèse et dans la réaction inflammatoire, certaines études suggèrent que COX-1 peut également produire des PG inflammatoires [127,252]. Ceci pourrait rendre compte d'une diminution de l'effet anti-inflammatoire des inhibiteurs sélectifs de COX-2 par rapport aux AINS inhibant COX-1 et COX-2 et des potentialités chimiopréventives d'inhibiteurs sélectifs de COX-1 vis-à-vis du cancer [30]. En effet, PGE_2, un des principaux médiateurs inflammatoires peut être produite, après action conjuguée de la c-phospholipase A2, qui fournit de l'acide arachidonique à COX-1, dont l'action est couplée à l'action d'une PGE_2 synthase cytosolique dénommée cPGES/p23 [237].

- **COX-2** est une enzyme essentiellement inductible, qui n'est exprimée à l'état basal que dans de rares tissus comme la prostate et le cerveau. L'extrémité 5' du gène de COX-2 possède dans sa région promotrice des éléments de réponse à des facteurs de transcription activables par les facteurs de croissance et les cytokines pro-inflammatoires (IL6), incluant des sites NF-kB, NF-IL6 et CRE [104].

→ COX-2 participe ainsi à la régulation de *différentes réponses physiologiques sous contrôle hormonal* (ovulation, nidation, travail utérin, métabolisme osseux) et est exprimée de façon quasi-ubiquitaire en situation inflammatoire [225].

→ COX-2 participe majoritairement à la réaction inflammatoire. En effet, le TNFα tout comme l'IL-1β, médiateurs de l'inflammation articulaire (polyarthrite rhumatoïde par exemple) activent les voies de signalisation de NF-κB et des MAP (Mitogen Activated Protein) kinases, qui activent des facteurs de transcription ayant des éléments de réponse dans la région promotrice de nombreux gènes précoces dont COX-2.

Tissu ou fonction (métabolites principaux)	Effets des prostanoïdes synthétisés par COX-1	Effets des prostanoïdes synthétisés par COX-2
Estomac (PGE_2, PGI_2)	- Secrétion mucus, bicarbonates - Maintien du flux sanguin sous-muqueux (vasodilatation) - Ré-épithélialisation - Cytoprotection adaptative	- En cas d'inflammation, d'infection, d'ulcération ou de tumeur - Ré-épithélialisation - Cicatrisation
Tonus vasculaire et hémostase - plaquette (TxA_2) - endothélium (PGI_2)	-Agrég.plaquet./vasoconstriction - Vasodilatation/ inhibition de l'agrégation plaquettaire	- Vasodilatation/ inhibition de l'agrégation plaquettaire
Rein (PGE_2, PGI_2) (ε de PG quand ↓ du débit rénal , insuffisance cardiaque, rénale ou cirrhose hépatique)	Vaisseaux rénaux / glomérules - maintien du débit sanguin rénal (vasodilatation)	Macula densa / cellules interstitielles) - Production de rénine - Rétrocontrôle tubuloglomérulaire (réabsorption sodée)
Système nerveux central (PGE_2, PGD_2) - Cellules endothéliales - Neurones - Cellules microgliales (en cas de stimulation par le LPS ou IL-1	Expression ubiquitaire, prédominante dans le cerveau antérieur - Fonctions complexes d'intégration (modulation du système nerveux autonome et sensoriel en particulier)	Cortex, hippocampe, hypothalamus - Maintien du débit sanguin cérébral? - Fièvre (synthèse de PGE_2 dans les vaisseaux perfusant l'hypothalamus si stimulation par LPS ou IL-1) - Développement, maturation et adaptation cérébrale à l'environnement - Neurotransmission ? - Mémorisation ? - Apoptose neuronale en cas d'activité synaptique médiée par N-méthyl-D-aspartate (cf Alzheimer) ? - Défense et plasticité cérébrale ? - Fièvre (synthèse de PGE_2) Moelle épinière (neurones sensoriels ou cellules non neuronales ?) - Transmission nociceptive
Inflammation, arthrite (chondrocyte, synoviocyte)		- Activité pro-inflammatoire - Activité pro-algésiante (sensibilisation des récepteurs périphériques)
Os	- A l'état basal: Résorption et formation osseuse ?	- En cas de lésion osseuse: Remodelage (ostéoblastes et cellules médullaires) ?
Utérus, ovaire (PGE_2, $PGF_{2\alpha}$)	- Pré-implantation de l'embryon dans l'endomètre - Maintien de la perméabilité du canal artériel	- Ovulation (rupture du follicule) - Nidation - Contractions utérines ($PGF_{2\alpha}$) - Perméabilité du canal artériel
Cancer (PGJ_2)		- Transformation maligne des cellules épithéliales précancéreuses - Effet anti-apoptotique ?

Tableau 2. Principaux lieux de biosynthèse et fonctions biologiques des eicosanoïdes produits *via* COX-1 et COX-2

La production exagérée de PGE_2 qui en résulte conduit à la triade symptomatique de la réaction inflammatoire (douleur, rougeur, chaleur), en sensibilisant les nocicepteurs, en induisant une hyper-perméabilité vasculaire et une vasodilatation. Plusieurs études récentes ont montré que la production de PGE_2 induite en réponse à l'IL-1β fait essentiellement intervenir la phospholipase A2 cytosolique et COX-2 [212]. De la même manière, il a été récemment montré que la production de PGE_2 induite par le TNFα dans les fibroblastes synoviaux fait intervenir une iso-enzyme IIA de la phospholipase A2 secrétée et COX-2 [12]. C'est dire le rôle majeur que jouent à la fois COX-2 dans l'initiation de la réaction inflammatoire, notamment au cours de la polyarthrite rhumatoïde, et le couplage de son induction avec l'activité de phospholipases qui lui fournissent l'acide arachidonique. De plus, l'activité de la COX-2 semble tout particulièrement couplée à celle de certaines PGE_2 synthases (PGES) membranaires [160], montrant que COX-2 est un intermédiaire essentiel dans la cascade d'évènements conduisant de la libération de l'AA à la formation des prostanoïdes.

→ COX- 2 jouerait également un rôle dans la phase de résolution de la réaction inflammatoire. En effet, il a récemment été démontré dans un modèle de pleurésie à la carragénine chez le rat, que l'expression de COX-2 est induite non seulement dans la phase initiale de l'inflammation (2 h), alors que la production de PGE_2 est maximale, mais également plus tardivement (48 h), lorsque la production de prostaglandines anti-inflammatoires telles que PGD_2 et 15-deoxy-Δ^{12-14}-PGJ_2 est maximale alors que celle de PGE_2 est devenue négligeable [78]. L'inhibition sélective de COX-2 (sélective ou non) procure un effet anti-inflammatoire initial (diminution du volume de l'exsudat, diminution de l'infiltrat leucocytaire) mais s'accompagne d'une pérennisation tardive de la réaction inflammatoire (augmentation de volume de l'exsudat, augmentation de l'infiltration leucocytaire à 48 h). Cet effet délétère tardif coïncide avec l'inhibition de synthèse de PGJ2 et est d'ailleurs corrigé par l'administration de cette PG. Le rôle anti-inflammatoire de COX-2 est aussi supporté par le fait que dans le modèle

d'inflammation de la patte induite par la carragénine, l'inflammation disparaît en 7 jours chez la souris sauvage alors qu'elle ne disparaît pas chez la souris déficiente en COX-2 [252]. Une explication possible à cette contribution tardive de COX-2 dans la réaction inflammatoire est que cette enzyme est capable de transformer en PGH2 des quantités beaucoup plus faibles d'acide arachidonique que COX-1. Or, dans la deuxième phase de l'inflammation, la quantité d'acide arachidonique biodisponible serait plus réduite que dans la phase initiale.

→ De la même manière COX-2 joue un rôle dans la cicatrisation de l'ulcère gastrique expérimental. Si l'inhibition de COX-1 par les AINS supporte majoritairement leur caractère ulcérogénique, il est apparu très étonnant que les souris déficientes en COX-1 ne développent pas d'ulcère, bien que leur niveau gastrique en PGE_2 soir réduit de 99% [127]. Il a été récemment démontré que ces souris ne développent pas d'ulcère en raison de l'effet compensateur de COX-2. En effet, l'inhibition sélective de COX-1 (par le SC-560) ou de COX-2 (par le célécoxib) n'induit pas d'ulcère gastrique, tandis que les lésions ulcéreuses apparaissent lors de l'association de ces deux inhibiteurs [253], suggérant qu'une inhibition des 2 enzymes était un pré-requis. De plus, un rôle de COX-2 a été démontré dans la cicatrisation de l'ulcère. En effet, les ulcères gastriques induits par de fortes concentrations d'indométacine cicatrisent avec difficulté chez les souris déficientes en COX-2 [252]. De même, les inhibiteurs sélectifs de COX-2 prolongent la cicatrisation des ulcères induits par brûlure chimique ou thermique chez les rats ou les souris [153, 217]. Cette ambivalence de COX-2 dans l'inflammation et sa contribution dans les phénomènes de cicatrisation devront probablement être prises en considération lors d'une administration chronique d'inhibiteurs sélectifs de COX-2.

→ COX-2 semble jouer également un rôle prépondérant dans les phénomènes de transformation cellulaire. Ainsi, la plupart des études suggèrent que COX-2, plus que COX-1, serait impliquée dans la carcinogénèse colique. Cependant, dans une récente étude, il a été

démontré qu'une déficience en COX-1 ou en COX-2 réduit dans des proportions similaires la formation de polypes chez des souris *Min*$^{-/+}$, c'est à dire présentant une mutation qui les expose au risque de développer non seulement des polypes mais aussi leur transformation maligne (aux alentours de 80%) [30]. Il semble que COX-1 et COX-2 pourraient exercer leurs propriétés anti-tumorales par des mécanismes différents. En effet, une étude récente a suggéré que COX-1 agirait dans les stades initiaux de la carcinogénèse en protégeant les cellules souches de la mort induite par l'atteinte de leur ADN [98], tandis que COX-2 pourrait contribuer au développement tumoral après mutation du gène *APC* [192]. Les études chez les souris déficientes confirment que COX-1 et COX-2 jouent des rôles propres dans la tumorigénèse intestinale et qu'elles sont toutes les deux des cibles potentielles à visée thérapeutique.

II.1.3 Nouvelle vision de la biosynthèse des eicosanoïdes

La découverte des iso-enzymes des COXs a conduit à reconsidérer totalement la « théorie de la COX » de Vane et à proposer la « **théorie des COXs** » avec la dichotomie suivante: une COX constitutionnelle, COX-1, jouant un rôle majoritairement physiologique (gastroprotection, agrégation plaquettaire, régulation de l'équilibre hydrosodé,...) et une COX inductible, COX-2, jouant un rôle dans la mitogénèse, la reproduction, l'inflammation et l'hyperalgie. De plus, des études ont permis récemment de comprendre les liens privilégiés qui existent entre les isoenzymes de COX et certaines prostaglandines synthases. On savait, par exemple, que la production de TXA_2 implique essentiellement la COX-1 plaquettaire alors que la production de PGE_2 implique essentiellement COX-2 dans différents types cellulaires, en particulier les monocytes. Dans certains cas, cette « spécialisation » fonctionnelle s'explique par le ségrégation des isoenzymes, comme par exemple, l'expression unique de COX-1 dans la plaquette qui est dépourvue de noyau. En revanche, dans la plupart des cas, les cellules sont capables d'exprimer les 2 isoenzymes de COXs, dont le fonctionnement est indépendant l'une

de l'autre, et dépendant des conditions physiques. Ainsi sait-on maintenant que les PG synthases périnucléaires [thromboxane synthase (qui conduit à la production de TXA_2), PGI synthase (qui conduit à la production de PGI_2), et PG synthases membranaires (qui conduisent à la production de PGE_2)] sont fonctionnellement liées à COX-2 tandis que les PG synthases cytosoliques [cPGES (production de PGE_2 par exemple] sont fonctionnellement liées à COX-1. La PGD synthase utilise tantôt COX-1, tantôt COX-2 comme source de PGH_2, selon la nature du stimulus. Enfin, la quantité d'AA, fournie de manière endogène ou exogène, modifie le couplage entre les COXs et ces enzymes. Ainsi, comme nous l'avons vu, la production d'eicosanoïdes via COX-2 est favorisée en présence de faibles quantités d'AA. Quand COX-2 est absente (pas de stimulus), alors la production d'AA entraîne le fonctionnement de COX-1, ce qui est également le cas dans les systèmes cellulaires exprimant les 2 isoenzymes lorsqu'on est en présence d'un large excès d'AA.

II.2. Classification des AINS selon leur sélectivité d'inhibition des COXs

La nouvelle théorie des COXs a conduit l'industrie pharmaceutique à synthétiser des molécules inhibant sélectivement COX-2, dans l'espoir d'obtenir des anti-inflammatoires efficaces, respectant la synthèse des prostanoïdes physiologiques *via* COX-1. Ces molécules devaient théoriquement posséder une tolérance digestive et rénale accrue et être dépourvues de propriétés anti-agrégantes plaquettaires. Cette dichotomie a conduit à proposer une nouvelle classification des AINS, faisant appel à la notion de sélectivité pour l'une ou l'autre des isoenzymes et s'appuyant sur des critères enzymatiques, pharmacologiques et cliniques.

II.2.1. Critères enzymatiques ou biochimiques

Le niveau de sélectivité des AINS pour COX-1 et COX-2 a tout d'abord été estimé en utilisant des modèles *in vitro*. Le pouvoir inhibiteur d'un composé chimique vis-à-vis d'une enzyme est exprimé sous la forme d'une IC_{50}, qui est la concentration de la molécule qui réduit de 50% l'activité de l'enzyme. Pour les AINS, un index de sélectivité pour les isoformes de COXs peut alors être déterminé sous la forme du rapport de leurs IC_{50} pour COX-1 et COX-2. Plus le rapport IC_{50} COX-2/COX-1 est bas et plus la sélectivité vis-à-vis de COX-2 est élevée.

Ces indices peuvent alors être utilisés pour comparer le pouvoir inhibiteur des AINS sur les COXs, l'hypothèse étant que le degré de sélectivité vis-à-vis de COX-2 serait inversement corrélé à la capacité d'induire des effets indésirables cliniques. Cependant, une multitude de systèmes *in vitro* a été utilisée pour déterminer les activités inhibitrices sur les COXs, ce qui a généré une multitude d'IC_{50}s et d'indices de sélectivité. Il doit être noté que les indices de sélectivité COX-2/COX-1 ne peuvent être calculés légitimement que lorsque les courbes de la réponse inhibitrice en fonction de la dose d'AINS sont parallèles pour COX-1 et COX-2, ce qui n'est pas toujours le cas.

Plusieurs types de systèmes *in vitro* ont été utilisés pour caractériser l'activité inhibitrice vis-à-vis des COXs des AINS. Chaque système a des avantages, mais est aussi associé à certains inconvénients, qui peuvent être inhérents au système lui-même, ou à la manière dont le système est utilisé. Ces différences expliquent que les comparaisons entre les différents systèmes ne sont pas possibles même lorsqu'il s'agit d'un même système ayant des conditions expérimentales différentes. En effet, les sources de variations sont nombreuses entre les systèmes, qu'il s'agisse l'origine de l'enzyme (humaine ou animale), de l'utilisation de cellules normales ou immortalisées ou transfectées, de l'utilisation de cellules intactes ou d'homogénats cellulaires (fractions microsomales par exemple) ou d'enzymes isolées, du temps d'incubation des cellules avec le médicament à tester, de la méthode d'induction de COX-2 (nature du

stimulus, durée d'incubation), de la composition du milieu utilisé pour cultiver les cellules (présence ou non de protéines). La présence de protéines est particulièrement importante puisque les AINS sont liés à plus de 90% aux protéines plasmatiques.

Le premier système *in vitro* ayant permis de comparer le pouvoir inhibiteur des AINS a utilisé des cellules endothéliales aortiques bovines comme source d'une activité COX-1 et des macrophages de souris stimulés par du LPS comme source d'une activité COX-2 [151]. Ce système présentait l'avantage d'avoir des temps d'incubation entre les inhibiteurs et le substrat (acide arachidonique) identiques pour les deux types cellulaires, point important puisque l'inhibition de COX-2 est temps-dépendante ou d'interaction lente [36]. Les principaux inconvénients de ce système étaient qu'il comportait des cellules d'origine animale et que sa validité variait en fonction de la nature chimique des AINS (fiabilité faible pour les oxicams sur COX-1) [36, 171]. L'utilisation de cellules animales était également le principal inconvénient du système utilisé par Engelhardt et coll.[61], même si l'utilisation d'un type cellulaire (macrophages de cochon non stimulés pour COX-1 et stimulés pas le LPS pour COX-2) a permis d'appliquer un temps d'incubation identique entre les molécules à tester et les deux isoformes, ce qui est un avantage notable du système. Un autre système a utilisé des enzymes purifiées d'origine animale: il s'agissait pour COX-1 d'enzymes extraites de vésicules séminales bovines ou ovines et pour COX-2, d'enzymes extraites de placenta ovin [61, 71, 115, 246]. L'origine de ces enzymes a un intérêt essentiellement historique, puisque la synthèse des PG a été décrite pour la première fois dans des vésicules séminales [62, 81] et que l'induction de COX-2 a été démontrée pour la première fois dans les ovaires de souris [222] et dans le placenta humain [223]. L'inconvénient principal de ces études résidait dans le fait que ces enzymes n'étaient pas d'origine humaine et que les cellules n'étaient pas des tissus cibles habituels des AINS. De plus, l'utilisation de préparations enzymatiques, qu'elles soient sous forme d'enzymes purifiées ou d'homogénats cellulaires et de microsomes, ne permettait pas de

tenir compte de certains processus cellulaires comme le transport et les interactions membranaires, qui sont cruciaux dans la distribution intracellulaire des AINS. Les homogénats cellulaires et les microsomes ont ensuite été utilisés dans des études où les enzymes recombinantes étaient exprimées dans des cellules transfectées avec les gènes de COX-1 et COX-2 [125, 147, 197]. L'utilisation d'enzymes recombinantes, qu'elles soient murines ou humaines, avaient deux principaux avantages: 1/ le même système pouvait être utilisé pour les deux isoformes de COX ; 2/ l'induction de COX-2 n'étant pas nécessaire, les mêmes temps d'incubation pouvaient être utilisés pour les deux isoformes de COXs. Dans une étude utilisant des isoformes murines recombinantes [147], les AINS standards testés avaient une activité inhibitrice supérieure sur COX-1 que sur COX-2. Cette étude a d'ailleurs suggéré que le 6-MNA, le métabolite actif de la nabumétone, serait sélectif de COX-2. Cependant, cette sélectivité n'a pas été confirmée dans plusieurs autres systèmes [31, 199, 266], y compris un système identique utilisant des enzymes recombinantes humaines. Les études avec des enzymes recombinantes humaines, si elles présentent l'avantage de faire appel à des enzymes autologues, utilisent cependant des cellules animales pour la transfection (cellules CHO, Sf9, Sf21). De plus, les résultats obtenus présentent une grande variabilité qui résulte en grande partie de la teneur variable en protéines dans les milieux d'incubation.

Malgré toutes ces sources de variations entre les systèmes, certaines molécules comme le méloxicam et le nimésulide ont montré qu'elles inhibaient préférentiellement COX-2, et quelques nouveaux composés, tels que le NS-398 et le L-745,337 inhibaient sélectivement COX-2 (ratio IC_{50} COX-2/COX-1 $<<$ 0,003) [173]. Par la suite, les études *in vitro* de la sélectivité pour les COXs ont fait appel à des lignées cellulaires immortalisées exprimant les 2 COXs [191]. Comme pour les cellules transfectées, ces cellules ne pouvaient pas être considérées comme représentatives de l'organisme, rendant les résultats non extrapolables aux conditions physiologiques.

En conclusion, parce que les résultats de ces études sont très dépendants du modèle utilisé, les critères biochimiques (*in vitro*) de sélectivité ont surtout un très grand intérêt pour le screening des molécules et ne représentent, encore à l'heure actuelle, que la première étape de détermination du degré de sélectivité d'un AINS pour les COXs.

Puisque le meilleur système doit utiliser des cellules humaines comme sources des isoenzymes de COXs, un nouveau système, dit « sur sang total », utilisant les plaquettes humaines comme source de COX-1 [182] et des cellules mononuclées activées comme source de COX-2 a été proposé [17, 80, 179, 181, 266]. Ce système sur sang total est devenu et reste encore actuellement la méthode de référence pour la mesure de la sélectivité des AINS pour COX-1 et COX-2. Le niveau d'inhibition de COX-1 (inhibition de la production plaquettaire de TXB_2 après coagulation spontanée) et de COX-2 (inhibition de la production leucocytaire de PGE_2 après stimulation par du LPS ou de l'IL-1) par des concentrations croissantes de l'AINS testé permet de construire des courbes concentration / niveau d'inhibition pour COX-1 et COX-2 et de déterminer la concentration qui inhibe 50% de la production de TXB_2 et donc de l'activité de COX-1 (IC_{50} COX-1) et 50% de la production de PGE_2 (IC_{50} COX-2). Ainsi, peut-on déterminer facilement un indice de sélectivité IC_{50} COX-1/COX-2, qui reflète le degré de sélectivité de l'AINS pour COX-2 comme évoqué précédemment.

Le principal inconvénient de cette méthode réside dans le fait que, parce que l'étude de COX-1 est réalisée pendant la coagulation, phénomène plus rapide que l'activation de COX-2 par le LPS, différents temps d'incubation sont nécessaires (évaluation de l'activité de COX-1 après quelques minutes de coagulation , alors que l'évaluation de COX-2 a lieu le plus souvent après 24 heures de stimulation par le LPS et après ajout d'aspirine pour inhiber COX-1). Ces différents temps d'incubation rendent peut-être invalide la superposition des courbes d'inhibition pour COX-1 et COX-2, et donc le calcul du rapport de leurs IC_{50}. Plusieurs variantes de ce système ont été proposées pour tenter de résoudre ce problème (évaluation de

COX-1 après 24 heures de stimulation par du ionophore calcique et non après coagulation), mais l'utilisation d'une activation non physiologique de COX-1 reste non satisfaisante. Bien que les doses de LPS, les temps de pré-incubation et le mode de stimulation de COX-1 aient été variables, les différentes études ont rapporté des résultats assez similaires dans la plupart des cas [173]. Ainsi, l'analyse de ces études a permis de montrer que:

1) l'aspirine inhibe sélectivement COX-1 à faible concentration [ratios IC_{50} COX-2/COX-1 > 60 [266]],
2) les AINS standards ont des propriétés inhibitrices voisines pour les 2 COXs, bien qu'il existe des ratios d'inhibition différents en fonction des AINS: l'ibuprofène serait inhibiteur préférentiel de COX-1 [ratios de 2 [179]), 6 [266] et même > 30 [17]] tandis que le diclofénac inhiberait davantage COX-2 que COX-1 [ratios de 0.4 [17], 0.7 [266]],
3) certains AINS comme le méloxicam [ratios aux alentours de 0.09 [179]], l'étodolac [ratio de 0.1 [80]] et le nimésulide [ratios de 0.06 [181] et 0.2 [266]] inhibent préférentiellement COX-2,
4) certains composés tels que le DFU, le L-745,337, le SC-58125, le NS-398, le SC5835 (célécoxib) et le MK966 (rofécoxib) inhibent fortement COX-2 sans inhiber COX-1. [ratios inférieurs à 0.01 [17, 179, 180, 200, 254]].

Cependant, l'extrapolation de ces résultats *in vitro* sur sang total, à des conditions *in vivo* après prise d'AINS, doit se faire avec prudence. En effet, ces mesures *in vitro* ne tiennent pas compte des métabolites actifs des AINS, en particulier pour les pro-drogues, telles que la nabumétone, qui est inactive mais dont le métabolite, 6-MNA est actif. De plus, même si le modèle *in vitro* sur sang total permet de tenir compte de la liaison protéique des AINS, les IC_{50} obtenues *in vitro* ne tiennent pas compte des concentrations sanguines d'AINS réellement obtenues lors de la prise d'un AINS. C'est pour ces raisons que différents systèmes d'étude *ex vivo* ont vu le jour, pour mieux prédire la sélectivité *in vivo* sur les COXs des AINS.

II.2.2. Critères de pharmacologie expérimentale (sélectivité tissulaire)

Si les monocytes et les plaquettes utilisés dans le modèle sang total ne sont pas des cibles idéales, les études permettant de déterminer l'effet des AINS sur la production de PG dans des tissus plus appropriés (cellules gastriques pour COX-1 et synoviocytes pour COX-2 par exemple), qu'elles soient *in vitro, in vivo* ou *ex vivo* sont difficiles à mettre en place et doivent faire l'objet d'une validation rigoureuse. En effet, l'utilisation de ces cibles cellulaires pose des problèmes méthodologiques parce que la production de PG est susceptible d'augmenter durant le prélèvement tissulaire, faussant de ce fait les résultats des dosages et parce que cette méthode ne permet pas de tenir compte de la fixation protéique, contrairement au modèle sang total [9, 47, 64, 101, 235].

II.2.3. Critères de pharmacologie clinique (sélectivité *ex vivo*)

Pour ces différentes raisons, l'évaluation sur sang total de l'inhibition des isoformes de COX représente aussi actuellement le meilleur système *ex vivo* d'évaluation de la sélectivité pour les COXs d'un AINS, parce qu'il présente de nombreux avantages et assez peu d'inconvénients. En effet, si la méthode sur sang total permet de construire des courbes *in vitro* d'inhibition des COXs et de déterminer des ratios d'IC_{50} en mettant des concentrations croissantes d'AINS dans le sang prélevé, cette méthode permet, de la même manière, de déterminer le niveau d'inhibition des COXs après prise orale d'AINS [175] et ceci à différents moments pharmacologiquement importants (pic et équilibre de concentration des AINS en particulier) [238] et non pas à un temps arbitraire après l'administration de l'AINS [231]. De cette manière, la détermination *ex vivo* de l'inhibition des isoformes de COX sur sang total a l'avantage de tenir compte de l'absorption, de la liaison protéique et de la biotransformation de l'AINS [107]. La pertinence clinique de cette méthode est renforcée par le fait que le niveau

d'inhibition de la production de PGE_2 gastrique est corrélé avec le niveau d'inhibition de COX-1 dans le sang total [37].

Cependant, il reste à déterminer si les courbes d'inhibition des COXs obtenues sur sang total *in vitro* pour un AINS permettent de prédire le niveau d'inhibition réellement mesuré sur sang total après prise d'AINS à partir de la concentration de l'AINS, en particulier au pic et l'équilibre de concentration. Si cette extrapolation était possible, la seule réalisation des études *in vitro* sur sang total permettrait d'estimer avec précision le niveau d'inhibition sur les COXs des AINS connaissant leur concentration au pic et au pic équilibre, et permettrait de se passer d'études sur sang total *ex vivo*, études lourdes à réaliser.

II.2.4. Critères cliniques (sélectivité *in vivo* pour COX-2)

Ces critères sont basés sur des estimateurs de la toxicité clinique des AINS. La principale limitation est que les critères sont différents d'une étude à l'autre: par exemple, visualisation d'ulcères gastro-duodénaux endoscopiques, mesure des pertes digestives de sang, incidence des épisodes d'hémorragie ou de perforation digestive, mesure de la survie des patients. C'est la raison pour laquelle cette estimation présente un certain nombre de biais dans l'interprétation des études cliniques:

→ Il ne peut être affirmé avec certitude que ces estimateurs (présence d'érosions, d'ulcères ou de perforation gastriques) sont en rapport uniquement avec l'inhibition de COX-1. Si ces lésions visualisées par endoscopie semblent bien corrélées à l'inhibition de COX-1 dans la muqueuse gastrique, on ne sait pas très bien si elles sont vraiment prédictives des lésions graves qui seules posent un réel problème de santé publique (perforations, saignements). Cependant, les premières études concernant le misoprostol (analogue de la PGE_1) ont suggéré une corrélation entre la présence d'ulcères endoscopiques et le pronostic des patients [219], même s'il s'agissait de lésions de faible diamètre (3 mm et davantage).

→ la relativement faible incidence de ces effets indésirables digestifs graves impose d'étudier les patients sur de longues périodes pour observer des différences ayant une pertinence physiopathologique [14, 218].

II.2.5. Nouvelle classification des AINS

A partir de ces critères enzymatiques, pharmacologiques et cliniques, le groupe international d'étude de COX-2 [134] a proposé une nouvelle classification distinguant les AINS en 4 catégories:

(1) les inhibiteurs sélectifs de COX-1 correspondant à l'aspirine à faible posologie puisque le SC-560 n'a jamais été utilisé chez l'Homme à ce jour,

(2) les inhibiteurs non sélectifs des COXs correspondant à la majorité des AINS classiques, dont les courbes d'inhibition *in vitro* de COX-1 et COX-2 sont proches. *Ex-vivo*, ces AINS inhibent fortement la COX-1 plaquettaire aux posologies anti-inflammatoires, même si pour certains, l'inhibition de COX-2 est supérieure à celle de COX-1. Ces AINS classiques, donnés au long cours chez les sujets souffrant de polyarthrite rhumatoïde entraînent à terme l'apparition d'un ulcère dans près de 20 % des cas et d'un saignement digestif dans 1 à 4 % des cas par an [216],

(3) les inhibiteurs préférentiels de COX-2 correspondant au méloxicam (MOBIC®), au nimésulide (NEXEN®), et à l'étodolac (LODINE®). Ils inhibent significativement COX-2 sans inhiber significativement COX-1 *in vitro* (rapport d'inhibition entre 2 et 100 fois) et *ex vivo* ont un effet inhibiteur modeste sur la COX-1 plaquettaire aux faibles posologies anti-inflammatoires. En revanche, ils sont responsables d'une inhibition significative de COX-1 quand leur posologie augmente, c'est-à-dire aux posologies maximales recommandées [247].

(4) les inhibiteurs sélectifs de COX-2 correspondant au célécoxib, commercialisé par Pharmacia en partenariat avec Pfizer sous le nom de CELEBREX® et le rofécoxib

commercialisé par Merk Frosst sous le nom de VIOXX®. Pour ces molécules, la concentration qui inhibe COX-1 est plus de 100 fois supérieure à la concentration qui inhibe COX-2 *in vitro*. Ces molécules n'inhibent pas significativement COX-1 *ex vivo* même à posologie thérapeutique maximale (<10%) et n'induisent pas d'augmentation du temps de saignement, de réduction de l'agrégation plaquettaire induite par l'acide arachidonique [247].

II.3. Pharmacologie clinique d'inhibiteurs des COXs ayant une tolérance digestive améliorée

II.3.1. Inhibiteurs préférentiels de COX-2

II.3.1.a. Méloxicam (MOBIC®)

La tolérance digestive du méloxicam est améliorée par rapport aux anti-inflammatoires classiques [55, 73], expliquant qu'il soit commercialisé aux USA comme un inhibiteur sélectif de COX-2 à la posologie de 7,5mg/j. Cette décision découle essentiellement d'une méta-analyse publiée en 1999. Parmi 62 études concernant le méloxicam, cette étude a compilé les résultats de 12 études randomisées s'intéressant aux effets indésirables digestifs du méloxicam. Cette méta-analyse a en particulier repris les résultats de l'étude internationale MELISSA (Meloxicam Longterm I Safety Study A)[tolérance digestive du méloxicam 7,5 mg/j (n = 4635) *vs* diclofénac LP 100 mg/j (n=4688) dans l'arthrose, pendant 28 jours] qui a montré que le méloxicam était responsable d'une incidence moindre d'effets indésirables digestifs globaux (13% vs 19% p<0,001), de dyspepsie (p<0,001), de vomissements (p<0,05), de douleurs abdominales (p<0,001) et de diarrhée (p<0,001) que le diclofénac, mais avec une moindre efficacité sur le soulagement, estimé par échelle analogique visuelle. Ceci expliquait que le méloxicam était davantage abandonné pour manque d'efficacité que le diclofénac (80 fois sur 4635 vs 49 fois sur 4688) (p<0,001) [92]. Dans la méta-analyse, le méloxicam était

responsable de moins d'effets indésirables digestifs (odds ratio 0,64 ; intervalle de confiance 95% 0,59-0,69), d'une incidence moindre de dyspepsie (odds ratio 0,73 ; 95% CI, 0.64-0.84) et d'effets indésirables graves (perforation, saignement, ulcères symptomatiques) (odds ratio = 0,52; 95% CI, 0,28-0,96), et s'accompagnait moins fréquemment d'un arrêt du traitement pour mauvaise tolérance digestive que le diclofénac (odds ratio = 0,59; 95% CI, 0,52-0,67) [209]. Cependant, cette méta-analyse présente la limitation de ne concerner que des études sur le méloxicam à faible posologie, ce qui ne permet pas d'extrapoler ces résultats à la posologie de 15 mg/j. En effet, le risque d'effet indésirable digestif grave à type d'ulcère perforant ou de saignement n'est pas nul avec ces AINS (5 cas de perforation, d'ulcère ou de saignement sous méloxicam 7,5 mg/j contre 7 avec le diclofénac) [92], à fortiori à posologie élevée [178].

II.3.1.b. Nimésulide (NEXEN®)

Comme pour le méloxicam, plusieurs études ont montré que le nimésulide 100 mg 2 fois par jour est aussi efficace que le naproxène 750 mg en 2 prises pour réduire l'intensité de la douleur arthrosique à 6 et 12 mois et que la prise de nimésulide s'accompagne d'une incidence légèrement plus faible d'effets indésirables digestifs (47% versus 54%) [119].

II.3.2. Inhibiteurs sélectifs de COX-2 commercialisés

II.3.2.a. Rofécoxib(VIOXX®)

L'étude VIGOR (Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research) était une étude en double aveugle, randomisée, stratifiée en groupes parallèles incluant 8076 patients (âge moyen 58 ans, essentiellement des femmes) dans le but de comparer l'incidence d'effets indésirables gastro-intestinaux avec le rofécoxib 50 mg/j et le naproxène 1g/j au long cours (médiane 9 mois) chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (PR) [14]. Ces patients recevaient des corticoïdes dans 60% des cas, et avaient des ATCD de perforation, d'hémorragie ou d'ulcère

symptomatique gastro-duodénaux dans 8% des cas (limite éthique). Les 2 AINS ont présenté une efficacité comparable sur la douleur et les symptômes de la PR (Global Assessment of Disease Activity et Modified Health assessment). Le taux de sortie d'étude pour inefficacité était comparable dans le groupe rofécoxib (6,3%) et naproxène (6,5%). L'incidence des complications graves (perforation, saignement, ulcère peptique symptomatique) était de 4,5% patient-année dans le groupe naproxène contre 2,1% patient-année dans le groupe rofécoxib, soit une différence de 54% ($p<0,001$). Ainsi, il faut traiter pendant un an 41 patients par rofécoxib plutôt que par AINS classique pour éviter une complication digestive grave.

Les résultats concernant les effets indésirables digestifs chez ces patients atteints de PR étaient comparables à d'autres études concernant des patients traités pour poussée d'arthrose avec le rofécoxib et d'autres AINS [128]. L'étude de Langman était une méta-analyse de 8 études conduites entre décembre 1996 et mars 1998. Il s'agissait d'études en double aveugle, randomisées de phase IIb/III concernant le rofécoxib dans la poussée d'arthrose avec symptomatologie douloureuse prédominante. Ces études incluaient une étude de dose-réponse de 6 semaines, 2 études d'efficacité à 6 semaines contre ibuprofène et placebo, 2 études d'efficacité à un an contre le diclofénac, 2 études endoscopiques à 6 mois contre l'ibuprofène et placebo et une étude d'efficacité à 6 semaines contre nabumétone et placebo. Cette étude incluait 5435 patients d'âge moyen 63 ans (38-94 ans), dont 72,9% de femmes. Globalement, le rofécoxib était utilisé à la posologie de 12,5 (1209 patients), 25 (545 patients), ou 50 mg/j (1603 patients respectivement), l'ibuprofène à 800 mg 3 fois par jour (847 patients), le diclofénac à 50 mg 3 fois par jour (590 patients) et la nabumétone à 1500 mg/j (127 patients). Cette étude a montré que l'incidence annualisée des complications graves (perforation, saignement, ulcère symptomatique) était significativement inférieure dans le groupe rofécoxib (1,3%) que dans le groupe AINS classiques (1,8%) ($p = 0,046$; taux pour 100 patient-années, 1,33 contres 2,60; risque relatif de 0,51; intervalle de confiance à 95% à 0,26-1,00).

L'incidence cumulée des symptômes dyspeptiques était aussi inférieure avec le rofécoxib (23,5%) contre 25,5% (P = 0,02) pour les 6 premiers mois, alors que les taux étaient similaires au delà de 6 mois de traitement. Par ailleurs, l'étude de Laine [122] a montré que chez 742 patients souffrant d'une arthrose des membres mais n'ayant aucune lésion endosopique gastrique qui prenaient quotidiennement 25 ou 50 mg de rofécoxib ou 2400 mg d'ibuprofène, l'incidence cumulée d'ulcère gastroduodénal (supérieur ou égal à 3 mm de diamètre) à 12 semaines était similaire au placebo pour le rofécoxib (placebo, 9,9%; 25 mg rofécoxib, 4.1%; 50 mg rofécoxib, 7,3%) et était significativement moindre qu'avec l'ibuprofène (27,7%). A 24 semaines, les taux d'ulcères étaient respectivement de 9,6% avec 25 mg/j de rofécoxib et 50 mg/j de rofécoxib, et 14,7% et de 45,8% avec l'ibuprofène, ($p < 0,001$, ibuprofène vs 25 and 50 mg rofécoxib).

Plus récemment encore, l'étude de Watson regroupant 8 études de phase IIb/III en double aveugle, randomisées, incluant 5435 hommes et femmes arthrosiques a comparé le rofécoxib à 12,5, 25 et 50 mg vs ibuprofène 2400 mg, diclofénac 150 mg, et nabumétone 1500 mg [255]. Le nombre d'arrêt de traitement en raison d'effets indésirables digestifs pendant les 12 mois de l'étude était plus bas avec le rofécoxib qu'avec les autres AINS comparateurs (8,2 vs 12,0 pour 100 patients-années; risque relatif, 0,70; 95% intervalle de confiance, 0,52-0,94 ; p=0,02). L'incidence des effets de type dyspepsie à 6 mois était également plus bas avec le rofécoxib qu'avec les autres AINS (69,3 vs 85,2 pour 100 patients-années; risque relatif, 0,85; 95% IC, 0,74-0,97 ; p= 0,02), bien que cette différence diminuait pour une durée supérieure de traitement.

L'étude de Hunt a aussi montré que la perte digestive d'hématies à 4 semaines mesurée par l'excrétion fécale de radioactivité (Chrome 51) chez le patients prenant de l'ibuprofène (800 mg x 3/j) était significativement plus élevée que chez les sujets prenant du rofécoxib (25 mg/j) (ratio de 5,2), ou 50 m/j) (ratio de 2.6) ou du placebo (ratio de 2,1) ($p < 0,001$) [102].

Récemment, les résultas compilés de 2 études identiques de la tolérance à 12 semaines du rofécoxib à la posologie quotidienne de 25 mg (n=390) ou 50 mg (n=379), comparée à celle du placebo (n=371), et de l'ibuprofène 2400 mg (n=376) ont été publiés. Si cette étude a confirmé que chez le patient arthrosique, que le risque d'observer un ulcère endoscopique et surtout un saignement digestif était multiplié par 4-5 en cas d'antécédent d'ulcère gastro-intestinal ou en cas d'érosion initiale à l'endoscopie, quel que soit le groupe, la présence d'*Helicobacter pylori* n'augmentait pas ce risque. Le rofécoxib n'a pas influencé le risque d'ulcère ou de saignement dans aucun des groupes (résultats identiques au placebo) et a été mieux toléré que l'ibuprofène. Ces résultats suggèrent que le rofécoxib n'entrave pas la cicatrisation des ulcères établis et n'augmente pas leur incidence [94].

Parce que d'autres études ont montré que l'administration pendant 6 semaines de 75 mg de diclofénac et de 200 mg de misoprostol (ARTOTEC 75 ®) 2 fois par jour chez 1203 patients souffrant d'une arthrose symptomatique du genou ou de la hanche et ayant des antécédents documentés par endoscopie d'ulcère gastrique, pylorique ou duodénal provoque une incidence d'ulcères gastrique ou duodénal moindre que la nabumétone (documentation par endoscopie), administrée à la posologie de 1500 mg une fois par jour (4% vs 11%), et comparable au placebo [3], une étude a comparé l'incidence d'effets indésirables spontanément rapportés à 6 semaines chez des patients arthrosiques, de 40 ans et plus, traités par 25 mg de VIOXX® et par ARTOTEC 75 ® 2 fois par jour. Parmi les 483 patients (80,3% femmes, âge moyen 62 ans), ceux prenant le rofécoxib ont rapporté moins de diarrhée (6,2% vs 16,2% ($p<0,001$), moins d'effet indésirable de type douleurs abdominales (au moins un épisode) (52,9% vs 73,0% ($p<0.001$)), moins d'effet indésirable gastrique (dyspepsie) (28,9% vs 48,5% ($p<0,001$), moins de douleur gastrique (18,6% vs 29,9% ($p=0,004$)]. Pour une efficacité comparable, le traitement par VIOXX® a été moins interrompu pour des douleurs abdominales (0,4% vs 3,7% ($p<0,05$)), ou pour d'autres raisons (4,1% vs 9,1% ($p=0,029$)[1].

Tenant compte des effets indésirables rapportés et en considérant les économies générées par la réduction des ulcères sous rofécoxib, le traitement par rofécoxib *vs* d'autres AINS semble économiquement valide par rapport aux AINS classiques [187].

II.3.2.b. Célécoxib (CELEBREX®)

L'étude de Lanza a comparé la tolérance digestive de 250 mg/j de célécoxib (n = 51), de 800 mg trois fois par jour d'ibuprofène (n = 51), de 650 mg par jour d'aspirine (n = 17), et du placebo (n = 51) à 7 jours chez 170 sujets âgés de 18 à 54 ans, sans anomalie initiale de la muqueuse digestive à l'endoscopie. La muqueuse était évaluée à J7 par endoscopie (scores de 0 à 4), le critère de jugement étant le nombre de sujets développant un score supérieur ou égal à 2, c'est à dire développant au moins une érosion. En parallèle, l'activité de COX-1 était évaluée par le dosage sérique de TXB_2. Le pourcentage de sujets dont le score était supérieur ou égal à 2 était significativement plus bas dans le groupe célécoxib (12%) ($P < 0,001$) que dans le groupe ibuprofène (71%), aspirine (94%) et était similaire au groupe placebo (8%). L'ibuprofène et l'aspirine ont été les seuls à réduire la production sérique de TXB_2 ($P < 0,0001$) [129].

L'étude CLASS (Celecoxib long-term Arthritis Safety Study) est une étude en double aveugle, randomisée, dans laquelle 7968 personnes âgées de 18 ans et davantage ont reçu au moins une fois soit 400 mg de célécoxib 2 fois/j (3987), soit 800 mg d'ibuprofène 3 fois/j (1985), soit 75 mg de diclofénac 2 fois/j (1996). 72% des sujets avaient une arthrose et 68.5% étaient des femmes. L'aspirine (<325 mg/j) a été autorisée dans cette étude (de même que la prise de corticoïdes) alors que la prise d'anti-ulcéreux, d'antibiotiques pour le traitement d'*Hélicobacter Pylori* était proscrite. 4573 patients (57%) ont été traités pendant 6 mois. La posologie de célécoxib était 2 à 4 fois la posologie habituelle pour le traitement de la poussée d'arthrose ou de PR, l'idée étant de tester la tolérance de dosages élevés, tout en sachant qu'à

ces posologies, le célécoxib n'a pas montré une meilleure efficacité qu'aux posologies recommandées [8, 221]. Le choix de la posologie d'ibuprofène et de diclofénac a été arrêté en tenant compte des résultats des prescriptions (posologies le plus souvent employées dans la poussée d'arthrose et de PR). Cette étude a montré que le taux annuel de complications digestives graves (perforation, ulcère creusant et saignement) était moindre dans le groupe célécoxib, pourtant employé à forte posologie (2,08% contre 3,54% pour les patients sous ibuprofène ou diclofénac) (p=0,02). Cependant, le taux annuel de complication ulcéreuse (critère principal de jugement de l'étude) n'était pas significativement moindre dans le groupe célécoxib (0,76% vs 1,45%) (p=0,09).

Il faut noter que le taux d'ulcères (les résultats de l'étude sur 6 mois ayant été annualisés et exprimés en nombre d'évènements pour 100 patients-années d'exposition) observé dans le groupe célécoxib (0,76%) est bien supérieur au taux attendu (0,2 – 0,4%) en fonction des résultats antérieurs [65, 82] (analyse compilée de 14 études randomisées englobant 11008 patients). Ceci explique que l'effectif nécessaire pour la randomisation n'ait pas été suffisant pour démontrer une différence significative entre les groupes en ce qui concerne cet item.

Ce taux élevé d'ulcères dans le groupe célécoxib s'explique par le fait que 20,6% des patients prenaient de l'aspirine à faible posologie (<325 mg/j) dans cette étude, alors que ce pourcentage était deux fois moindre dans une étude précédente (Physician advice and individual behaviors about cardiovascular disease risk reduction-seven states and puerto Rico, 1997). Or l'aspirine à faible posologie est responsable d'une augmentation de risque d'hémorragie gastrointestinale [131, 227, 256], interférant de ce fait avec l'effet protecteur digestif du célécoxib. En effet, dans le groupe célécoxib , le risque relatif de complication ulcéreuse était de 4,5 chez les consommateurs d'aspirine. De plus, chez les consommateurs d'aspirine, l'incidence annualisée de complications graves était proche dans le groupe célécoxib (2,01%) et dans le groupe AINS classiques (2,12%) (p=0.92), de même que le risque relatif de

ces complications combinées aux ulcères symptomatiques (4,7% *vs* 6%) (p=0,49). Ainsi, même si le risque d'ulcère sous célécoxib chez les patients prenant de faibles posologies d'aspirine est diminué par rapport aux patients sous AINS classiques, cette différence semble limitée et l'effectif de patients ayant pris conjointement du célécoxib et de l'aspirine est trop faible pour mettre en évidence cette différence. Par contre, pour ce qui est des patients ne prenant pas d'aspirine, l'incidence annualisée de complications graves était plus faible avec le célécoxib qu'avec les AINS comparateurs (0.44% contre 1,27%) (p=0,04). De la même manière, l'incidence annualisée d'ulcères symptomatiques était plus faible dans le groupe célécoxib seul (1,4%) que dans le groupe AINS classiques (2,91%) (p=0.02). Il faut noter que l'incidence annualisée d'ulcères sous célécoxib seul (0,44%) était similaire au taux observé dans la population générale. Parce qu'aucun groupe placebo n'avait pas été inclus pour des raisons éthiques évidentes, cette étude n'a pas permis de calculer de risque d'ulcère attribuable au célécoxib.

La tolérance hépatique et rénale du célécoxib a été considére comme bonne, l'incidence de l'hypertension et des effets indésirables rénaux étant trouvés en plus faible proportion dans le groupe célécoxib que dans les groupes ibuprofène et diclofénac, et ce indépendamment de la prise d'aspirine.

Cependant, il faut souligner que seuls les résultats à 6 mois ont été publiés alors que cette étude prévue initialement sur 13 mois. De plus, davantage de patients ont quitté l'étude pour manque d'efficacité dans le groupe célécoxib (14,8%) que dans les autres groupes (12,6%)(p<0,002). L'origine du plus grand nombre de sorties d'étude dans CLASS que dans l'étude VIGOR est peu clair. On sait que le risque de développer un ulcère est supérieur chez les sujets ayant des antécédents ulcéreux ou de saignement (5%) qu'en l'absence d'antécédent digestif (0,4%). Une différence de recrutement des sujets entre les 2 études pourrait être une explication, bien que les patients avec ulcères peptiques aient exclus dans les 2 cas.

II.3.3. Cas particulier de la nabumétone (NABUCOX®)

La nabumétone à la posologie de 1 à 2 g a montré une efficacité identique au diclofénac 100 ou 200 mg/j chez 335 patients âgés (âge moyen 72 ans) présentant une athrose symptomatique et meilleure que le placebo. De plus, la nabumétone est mieux tolérée sur le plan digestif et hépatique [154]. Cette tolérance améliorée de la nabumétone par rapport aux AINS classiques avait été démontré dans une étude ancienne, la nabumétone présentant une tolérance digestive identique à l'association ibuprofène-misoprostol et meilleure que l'ibuprofène seul [203]. Ces premières études confirmaient l'intérêt des molécules non acides en terme de tolérance digestive, mais ce bénéfice a été abusivement attribué à une inhibition préférentielle de COX-2 qui, comme nous l'avons évoqué précédemment, n'est pas classiquement mise en évidence *in vitro* et encore moins *ex vivo* [32]. Il n'en reste pas moins que la nabumétone reste l'un des AINS les plus prescrits dans le monde dans les affections rhumatismales chroniques en raison de sa demi-vie de 24 heures, et de sa bonne tolérance générale [204].

II.3.4. Inhibiteurs de COX-2 en développement

II.3.4.a. Etoricoxib (ARCOXIA®)

Les premières études montrent que l'étoricoxib possède des activités anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique comparables à celle du rofécoxib dans les modèles animaux d'œdème et de douleur induite par la carragénine, d'arthrite par adjuvant ainsi que dans le modèle de fièvre induite par les endotoxines bactériennes. La tolérance digestive testée dans des modèles d'excrétion urinaire ou fécale de chrome^{51} après administration orale d'EDTA marqué au chrome^{51} ou injection intra-veineuse de $^{51}CrCl_3$ chez le rat et le singe est meilleure qu'avec le diclofénac, l'indométacine et le naproxène [200]. Les premières études cliniques de phase II ont montré que l'étoricoxib a une efficacité dans la prise en charge des symptômes de l'arthrose et de la douleur dentaire modérée à sévère (étoricoxib 120 mg a une efficacité

antalgique identique au naproxène et supérieure à l'ibuprofène 400 mg et à l'association paracétamol-codéine) [83, 140, 226]. Les premiers résultats des études de phase III montrent que l'administration d'étoricoxib s'accompagne de moins d'effets indésirables digestifs que celle d'ibuprofène. De plus, ni l'étoricoxib, même lorsqu'il est administré à une posologie 8 fois supérieure à celle étant efficace, ni ses principaux métabolites, n'ont d'effet inhibiteur significatif sur COX-1 [39]. Sa pharmacocinétique montre une grande linéarité entre sa posologie par voie orale (de 5 à 120 mg) et sa concentration plasmatique, sa demi-vie étant de 22 heures [3].

II.3.4.b. Valdécoxib (BEXTRA®) - parécoxib

En raison de sa faible hydrosolubilité, le célécoxib ne peut être administré par voie parentérale. C'est pourquoi le laboratoire Pharmacia a mis au point une prodrogue d'un inhibiteur sélectif de COX-2, le valdécoxib, qu'il a dénommée parécoxib sodique. Le parécoxib sodique, qui est rapidement transformé en valdécoxib (conversion totale en 30'), a démontré des propriétés antalgiques et anti-inflammatoires dans différents modèles animaux d'inflammation [236], justifiant son développement. Ainsi, le parécoxib sodique intraveineux est capable de diminuer l'hyperalgie dans le modèle d'inflammation à la caragénine chez le rat avec une IC_{50} de 5 mg/kg. Il diminue également la sévérité des lésions avec une IC_{50} de 0,08 mg/kg/j dans le modèle de polyarthrite par adjuvant. Chez le volontaire sain, la demi-vie d'élimination (transformation en valdécoxib) est de 1,7 heure, le taux maximum plasmatique étant obtenu en 30 minutes par voie veineuse et 1 heure par voie intra-musculaire. L'état d'équilibre pharmacocinétique est atteint en 7 jours. Les premières études suggèrent que le parécoxib sodique est bien toléré même à forte posologie (40 mg IV ou IM) [110, 111]. Une étude réalisée chez des sujets âgés de 65 à 75 ans a montré que l'incidence des anomalies endoscopiques est identique à 7 jours avec le parécoxib sodique (40 mg x 2/j IV) et avec le

placebo (0%), alors qu'elle est de 23% (ulcères gastroduodénaux) et 16% (ulcères gastriques) avec le kétorolac (15 mg IV)[99]. De plus, une administration unique de parécoxib sodique (20 et 40 mg IV) procure un effet antalgique supérieure à celui de la morphine (4 mg IV) dans les 24 heures après une hystérectomie (n=175), une myomectomie sous anesthésie (n=208)[126] ou la pose d'une prothèse de genou (n=208 et 42 patients). Dans ces indications, le parécoxib (40 mg IV) s'est avéré au moins aussi efficace que le kétorolac (30 mg IV), avec un profil de tolérance plus favorable. Cette efficacité antalgique a également été confirmée dans la douleur dentaire post-opératoire dans plusieurs essais contrôlés chez 304 à 457 patients: parécoxib 20 et 40 mg IM et IV aussi efficaces que kétorolac 30 ou 60 mg IM ; durée d'analgésie 40 mg supérieure à 20 mg) [40, 100, 148]. En pré- et post-opératoire, la posologie optimale semble être 40 mg IM ou IV [52]. Dans tous les cas, la tolérance digestive du parécoxib a été excellente, et supérieure à celle du kétorolac, le seul anti-inflammatoire utilisé par voie parentérale dans cette indication aux USA [27]. De plus, le parécoxib sodique ne modifie pas la fonction plaquettaire et le temps de saignement chez les sujets en bonne santé, qu'ils soient jeunes ou âgés [166]. Le valdécoxib est actuellement en phase III dans le traitement oral des symptômes arthrosiques, de la polyarthrite rhumatoïde et de la douleur. Le parécoxib sodique est soumis à la FDA pour la prise en charge de la douleur aiguë par voie veineuse et intra-musculaire.

Ainsi, les résultats concernant l'efficacité et la tolérance digestive du célécoxib, du rofécoxib, du valdécoxib et du parécoxib sodique montrent qu'ils partagent les propriétés antalgiques et anti-inflammatoires des AINS classiques mais provoquent des effets indésirables digestifs graves comparables au placebo et sont dépourvus d'activité anti-agrégante plaquettaire à ces posologies [220]. Ces résultats confirment l'intérêt de cette nouvelle classification des AINS.

II.4. Indications et perspectives thérapeutiques des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Les deux inhibiteurs sélectifs de COX-2 actuellement commercialisés en France, le célécoxib et le rofécoxib n'ont cependant ni des profils d'inhibition des COXs [le rofécoxib inhibe plus sélectivement COX-2 que le célécoxib [66]], ni des propriétés pharmacocinétiques (biodisponibilité différentes) identiques (voir tableau 3). Ces différences expliquent, au moins en partie, que ces molécules aient des indications différentes, ainsi que des effets indésirables, en particulier rénaux et vasculaires, eux aussi différents.

II.4.1. Rhumatologie et prise en charge de la douleur

Les AINS représentent une classe thérapeutique de choix dans le traitement de la douleur, en particulier post-chirurgicale. Dans cette indication, leur action résulte d'une inhibition de la production de PG qui ont la propriété de sensibiliser les récepteurs nociceptifs périphériques [58] et de favoriser la transmission médullaire nociceptive [264]. Or cette transmission nociceptive semble tout particulièrement impliquer les récepteurs spinaux du N-méthyl-D-aspartate (NMDA) via l'activation de COX-2 [56]. Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 semblent capables tout comme l'indométacine (inhibiteur non sélectif de référence dans cette indication), d'inhiber la réponse centrale [264] et locale [123] à la douleur.

Par ailleurs, l'induction de COX-2 a été observée dans le tissu synovial de patients souffrant de poussée congestive d'arthrose ou de polyarthrite rhumatoïde [114, 135]. De nombreuses études ont montré l'intérêt des coxibs dans la prise en charge de la douleur inflammatoire:

→ Le rofécoxib et le célécoxib ont un effet supérieur à celui du placebo et similaire à celui des AINS classiques dans le contrôle subjectif et objectif de la douleur et de l'inflammation chez les patients souffrant de gonarthrose et de coxarthrose [rofécoxib *vs* ibuprofène [93, 46],

rofécoxib *vs* diclofénac [21], rofécoxib *vs* SC-58635 (célécoxib) [220] ; célécoxib (100 et 200 mg/j) *vs* naproxène) [8, 33].

Propriétés	Rofécoxib	Célécoxib
Biodisponibilité orale (%)	92-93	60-85
Effet de l'alimentation	faible	Nulle, 10% si + lipides
Pic de concentration (h)	2-3	2-4
Demi-vie d'élimination (h)	9-21	8-12
Volume de distribution (l)	86-91	455±166
Métabolisme hépatique	Réduction cytosolique + CYP 450	Oxydation par CYP, 2C9 (+++) et 3A4
Interaction avec les inhibiteurs et inducteurs de cytochrome P450	Non	Oui
Interaction avec d'autres cytochromes	Inhibition de CYP-1A2	Inhibition de CYP-2D6
Interaction avec les digitaliques	Non	Non testée
Interaction avec warfarine	Cause une ↑ de 10% de l'INR	Cause une ↑ de l'INR (?)
Interaction avec méthotrexate faible poso.	A posologie suprathérapeutique	Non
Interaction avec anti-HTA	↑ la TA, ↓ effet anti-HTA	↑ la TA, ↓ effet anti-HTA
Influence de l'I. rénale	Peu d'effet	↓ de 43% l'aire sous la courbe
Influence de l'insuffisance hépatique sévère	↑ de 30-70 % l'aire sous la courbe	↑ de 40-180 % l'aire sous la courbe

Tableau 3: Pharmacocinétique clinique comparée du rofécoxib (VIOXX®) et du célécoxib (CELEBREX®)

→ Le célécoxib a une efficacité similaire aux AINS classiques dans le traitement des symptômes algiques de la polyarthrite rhumatoïde [14, 221]. A noter qu'il en va de même avec le rofécoxib dans les études de phase III même s'il n'est pas encore commercialisé dans cette indication.

Le rofécoxib possède des propriétés antalgiques permettant son emploi dans la douleur dentaire post-opératoire (autorisation de mise sur le marché aux USA dans cette indication). Une méta-analyse récente de 6 études contre placebo et contre naproxène (550 mg) ou ibuprofène (400 mg) évalue l'efficacité dans les 8 premières heures d'une prise unique de rofécoxib (7,5 à 500 mg). Cette étude a montré que l'efficacité du rofécoxib était dose-dépendante, que 50 mg était plus efficace que le placebo pour toutes les mesures d'efficacité, et qu'à cette posologie, le rofécoxib était aussi efficace que les AINS comparateurs [157]. Les résultats sont comparables avec le célécoxib qui a récemment obtenu son autorisation de mise sur le marché dans le soulagement des dysménorrhées et des douleurs aiguës.

Cependant, quelques auteurs suggèrent que comme COX-1 joue un rôle mineur dans l'inflammation [145], et que les études cliniques des coxibs n'ont pas été réalisées pour détecter de faibles différentes d'efficacité avec les AINS classiques mais plutôt pour montrer qu'il existe une efficacité comparable (effectifs plus faibles, évaluation peu fine de la douleur), il est difficile d'affirmer dans ces conditions que les coxibs ont des propriétés antalgiques et anti-inflammatoires totalement superposables à celles des AINS classiques. Bien que cette polémique reste ouverte, il faut tout de même rappeler que les coxibs ont des propriétés pharmacologiques comparables à celle des AINS classiques dans les modèles animaux d'inflammation aiguë ou chronique avec des effectifs et des tests adaptés [213]. D'autre part, les résultats compilés de 2 études de tolérance et d'efficacité à court terme (6 semaines) dans l'arthrose de hanche et de genou chez 736 patients ont montré que le rofécoxib à 12,5 and 25 mg a la même efficacité que l'ibuprofène 2400 mg/j et que le diclofénac (50 mg X3/j), la tolérance ayant été bonne dans les 3 groupes [205]. Ces études expliquent que dans la prise en charge des symptômes de l'arthrose le rofécoxib soit indiqué à la posologie de 12,5 et 25 mg par jour en 1 prise et le célécoxib à la posologie de 200 voire 400 mg en une à 2 prise. Dans le traitement des symptômes douloureux de la polyarthrite rhumatoïde, le célécoxib est employé à

la posologie de 200 mg et le plus souvent 400 mg en 1 à 2 prises quotidiennes. A noter que le célécoxib a obtenu depuis peu aux USA l'indication dans les douleurs aiguës et dysménorrhée. Si ces deux molécules n'ont pas d'indication légale dans le traitement symptomatique de la fièvre au cours de certaines affections inflammatoires sévères non infectieuses, une étude récente a montré que le rofécoxib a des propriétés anti-pyrétiques équivalentes au diclofénac et à l'ibuprofène [210].

II.4.2. Prévention et traitement des cancers

II.4.2.a. Adénome et cancer colorectal

Les AINS classiques tels que l'indométacine, le sulindac ou le piroxicam ont montré leur capacité à réduire le risque de développement d'une tumeur colique après induction par différents carcinogènes chez les muridés, l'effet étant suspensif à l'arrêt du traitement [241]. Plusieurs études chez l'homme ont également montré que la prise régulière d'aspirine ou d'autres AINS entraîne une réduction du risque de cancer colique [224] et une régression des adénomes existants chez les patients souffrant d'une polypose familiale [74].

De nombreux travaux suggèrent que la production de prostaglandines par COX-2 participe à la génèse [88] et à la progression du cancer colique. D'une part, les tumeurs colorectales expriment COX-2 en grande quantité alors que la muqueuse saine en est incapable [120]. D'autre part, les souris transfectées pour le gène de la polypose familiale ($APC^{\Delta 716}$) et déficientes homozygotes en COX2 présentent une diminution de 86% du nombre de polypes intestinaux et les souris n'ayant qu'une copie de COX-2 (déficience hétérozygote) ont une réduction des polypes de 66% [169]. Ces souris déficientes pour COX2 développent aussi 3 fois moins de papillomes cutanés induits chimiquement [242]. Enfin, les inhibiteurs de COX-2 protègent de la polypose intestinale les souris prédisposées génétiquement (mutation du gène anti-tumoral APC chez les souris *Min*) [169].

Cependant, l'importance de l'acide arachidonique dans le développement tumoral apparaît crucial car les souris déficientes pour le gène de COX-1 sont aussi protégées contre la formation de tumeurs intestinales et cutanées [30].

L'intérêt des inhibiteurs sélectifs dans la prévention tumorale n'est pas seulement issue des études sur l'animal. En effet, une étude randomisée contre placebo en double aveugle, réalisée chez 77 sujets souffrant de polypose familiale a démontré que les patients prenant 400 mg de célécoxib 2 fois par jour présentent à 6 mois une réduction de 28% du nombre de polypes colorectaux (- 4,5 % pour le placebo), de 37% de la somme des diamètres des polypes (- 4,9 % pour le placebo) et que 53 % des sujets sous 800 mg de célécoxib ont répondu au traitement (réduction d'au moins 25% du nombre de polypes) (4,5 % pour le placebo). Cette étude explique que le célécoxib ait été approuvé comme traitement adjuvant pour les patients présentant une polypose intestinale familiale aux Etats-Unis [228].

I1.4.2.b. Autres cancers

De la même manière que pour l'adénome et le cancer colique, les souris transgéniques qui surexpriment le gène de COX-2 spécifiquement dans les glandes mammaires développent une hyperplasie, des dysplasies et des tumeurs mammaires métastatiques [137]. Par ailleurs, les inhibiteurs sélectifs de COX-2, que ce soit le célécoxib ou le rofécoxib, réduisent la formation de tumeurs intestinales, du sein, du poumon, de la vessie et de la langue chez l'animal [4, 58, 138, 165, 194, 206, 215, 231].

Cependant, si l'effet des AINS sur la polypose intestinale familiale est indéniable [79, 240, 250], nous sommes en attente des résultats des études concernant l'intérêt de ces molécules dans la prévention de la transformation néoplasique des adénomes coliques et dans la prévention des autres cancers impliquant COX-2, tels que les cancers de l'œsophage, de la cavité buccale, de la langue, de la peau et de la vessie. L'avenir nous dira aussi quel est l'intérêt

d'associer les inhibiteurs sélectifs de COX-2 avec d'autres drogues anti-cancéreuses. Par exemple, le difluorométhylornithine (DFMO) qui a montré son efficacité dans la prévention tumorale dans un modèle murin de polypose intestinale familiale, qui est bien toléré chez l'homme et qui pourrait être essayé en combinaison avec le célécoxib [105]. Ce concept de combinaison de molécules chimiopréventives est aussi prôné par d'autres auteurs qui ont observé que le sulindac en combinaison avec un nouvel inhibiteur d'un récepteur de l'Epidermal Growth Factor fait mieux dans la prévention des tumeurs coliques des souris *Min* que chaque produit administré individuellement [243]. Il en va de même de l'intérêt possible des rétinoïdes en association avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans la prévention des tumeurs cutanées par exemple.

II.4.2.c. Mécanismes proposés

Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 pourraient réduire la tumorigènèse des cellules épithéliales selon plusieurs mécanismes:

→ en inhibant la conversion catalytique des procarcinogènes, tels que le benzopyrène, en carcinogènes par les COXs [261]. D'ailleurs, l'intérêt potentiel des coxibs dans la prévention et le traitement des tumeurs du poumon, de la vessie et de la cavité buccale est probablement en partie lié au fait que le benzopyrène contenu dans le tabac stimule COX-2, qui a son tour dégrade le benzopyrène en produit carcinogène.

→ en réduisant leur adhésion à la matrice extra-cellulaire et en favorisant leur apoptose [112, 244], selon des mécanismes qui pourraient être indépendants de p53 et partiellement indépendants d'APC [60, 156].

→ en réduisant l'angiogénèse induite par la tumeur [245], *via* la diminution de la production de VEGF.

→ en modulant la surveillance immune anti-tumorale. PGE_2, qui est exprimée en grande quantité dans le cancer colique, a la propriété d'inhiber l'expression, dans les cellules néoplasiques, des molécules HLA de classe II qui permettent aux leucocytes de les reconnaître et de les détruire. Les AINS en induisant l'expression des ces molécules de reconnaissance, favoriseraient l'immunité anti-tumorale [6].

Cependant, l'effet anti-tumoral des AINS ne s'exerce pas seulement par inhibition de la synthèse des prostaglandines. En effet, les AINS peuvent affecter le cycle cellulaire des cellules mammaires qui n'expriment pas les COX et ne produisent donc pas de PG [89, 141, 239]. Ce mécanisme d'action indépendant des COXs pourrait expliquer que certains AINS, tels que le sulindac et l'aspirine, qui inhibent peu ou pas COX-2 ont aussi une activité anti-proliférative [189].

II.4.3. Maladie d'Alzheimer et pathologies du système nerveux central et périphérique

II.4.3.a. Pathologies cérébrovasculaires ischémiques et hémorragiques

Si l'intérêt de l'aspirine dans la prévention primaire et secondaire de l'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique et de la pathologie coronarienne est bien établi, l'intérêt potentiel des AINS en phase aigüe de l'AVC hémorragique et ischémique n'est suggéré que depuis peu. Parce qu'ils sont capables d'inhiber la production d'éicosanoïdes vasoconstricteurs [72], l'utilisation d'AINS dans la prévention du vasospasme après hémorragie méningée parait séduisante. Les AINS inhibant sélectivement COX-2 sont dénués d'effet anti-agrégant plaquettaire et pourraient donc avoir un intérêt dans cette indication.

L'œdème cérébral vasogénique délétère qui apparaît dans les suites immédiates d'un accident ischémique cérébral est induit majoritairement par les PG [29], les leucotriènes et le thromboxane [142]. L'utilisation combinée d'un inhibiteur de la lipo- et de la cyclooxygénase (BW755C) lors de la reperméabilisation vasculaire semble minorer l'œdème cérébral et les

lésions de reperfusion [59]. Donnés en phase aiguë de l'infarctus cérébral, les AINS pourraient permettre d'en réduire la taille [177] en inhibant la production de médiateurs inflammatoires (le glutamate en particulier) qui, en plus d'être toxiques pour les neurones avoisinants, induiraient l'expression des COXs. Cette hypothèse semble confirmée par 2 études qui montrent que les AINS inhibiteurs non sélectifs de COX-2 (indométacine ou ibuprofène) réduisent la mort neuronale en périphérie de la zone ischémiée en minorant la production de radicaux libres et de dérivés de l'acide arachidonique [106, 34].

Or, COX-2 est particulièrement surexprimée dans les polynucléaires, les cellules vasculaires et les neurones en périphérie de la zone cérébrale ischémiée, indiquant son rôle potentiel dans l'apparition de l'œdème péri-lésionnel [103]. Si les arguments biologiques ne manquent pas pour suggérer l'intérêt des AINS et en particulier des AINS inhibant sélectivement COX-2 (d'autant plus intéressants que n'étant pas anti-agrégants plaquettaires, ils n'induiraient pas de transformation hémorragique de la zone ischémiée), aucune étude épidémiologique n'a démontré leur intérêt clinique dans cette indication.

II.4.3.b. Démence sénile de type Alzheimer (DSTA)

L'action protectrice des AINS envers la DSTA a été évoquée à travers différentes études épidémiologiques [146]. Les AINS semblent réduire le risque de développer la maladie dans la population générale [57, 229] et ceci de façon corrélée avec leur durée d'utilisation [229]. Ils semblent retarder l'âge de début de la maladie dans les familles à risque et ralentir la dégradation cognitive des malades [202]. Le risque relatif plus faible de développer une maladie d'Alzheimer observé lors d'un traitement par AINS classiques à posologie anti-inflammatoire (inhibition de COX-1 et COX–2) [risque relatif de 0,43 (0,23-0,75)] et par l'aspirine [0,5 (0,34-0,73)] à posologie anti-agrégante plaquettaire (65% des patients de cette étude) (inhibition sélective de COX-1) ou anti-inflammatoire (35% des patients de cette étude)

[270], suggère l'intérêt de l'inhibition sélective de COX-1 et/ou de COX-2 dans la prévention de la maladie d'Alzheimer. Cet effet positif des AINS s'oppose à celui des corticoïdes, qui sont des inhibiteurs de la phospholipase A2 et qui ont un effet plutôt délétère sur la maladie d'Alzheimer [271]. L'hypothèse d'un rôle favorable de l'inhibition des COXs, et en particulier de COX-2, sur la maladie d'Alzheimer s'appuie aussi sur des données biologiques montrant le rôle pro-apoptotique neuronal de COX-2, son effet générateur de radicaux libres neurotoxiques et son rôle dans l'activation microgliale, qui semble cruciale dans le développement de la maladie. Pourtant, si les AINS semblent réduire le risque de développer une MA, probablement en jouant un rôle sur la composante inflammatoire de la maladie, ils n'ont aucune d'efficacité sur le mécanisme causal de la neurodégénérescence [13]. Les études concernant le rofécoxib (deux études de phase II pour estimer si la molécule est capable de prévenir ou retarder l'apparition des symptômes de la MA chez des sujets présentant des troubles cognitifs modérés ou de retarder l'évolution de la MA quand elle est diagnostiquée) et le célécoxib (une étude débutée depuis 2 ans évaluant l'intérêt de la molécules quand le diagnostic de MA est posé) devraient permettre rapidement d'évaluer l'intérêt des inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans cette indication. Les premiers résultats semblent cependant assez décevants (SM. Sainali. International Springfield Symposium of Advances in Alzheimer Therapy - Stockholm 5-8 avril 2000, cité dans [272]).

II.4.3.c. Autres pathologies neurologiques

Les COXs sont impliquées dans une grande variété de pathologies neurologiques.

→ Les AINS présentent une grande efficacité dans le traitement des migraines simples [188]. L'expression de COX-2 induite lors d'une migraine accompagnée de déficits neurologiques [20] peut être inhibée par les AINS et les inhibiteurs de la synthèse de NO [149], suggérant l'intérêt potentiel des AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans cette indication.

→ Les AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2 pourraient avoir un intérêt dans certains types de pathologies neurologiques traumatiques, en particulier médullaires, ou inflammatoires, qu'elles soient périphériques [152] ou centrales telles que la sclérose en plaque [96] et dans l'encéphalopathie du virus de l'immunodéficience acquise (HIV) [53, 136] où il existe une augmentation des taux de PGE_2, PGF_2 et TXB_2 dans le liquide céphalorachidien, par ailleurs corrélée à l'altération neurologique [84].

→ Dans la maladie de Parkinson, les COXs pourraient de la même manière favoriser la production de radicaux libres toxiques pour les neurones dopaminergiques. *In vitro*, l'activité hydroperoxydasique des COX peut en effet catalyser l'oxydation de la dopamine en dopamine quinones, cette réaction pouvant être inhibée par l'indométacine [91,143]. A notre connaissance, le rôle de COX-2 n'a pas été étudié dans cette pathologie.

II.5. Limitations possibles des inhibiteurs sélectifs de COX-2

II.5.1. Risque cardiovasculaire

Les inhibiteurs sélectifs de COX-2, depuis leur autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis en 1999, ont été vendus à concurrence de 3 millions de dollars et représentent un volume de prescription supérieur à 100 millions par an (IMSHealth). Si les coxibs présentent une tolérance digestive très améliorée par rapport aux AINS classiques pour une efficacité comparable, plusieurs articles appellent à la prudence quant à la prescription des coxibs chez les sujets à risque de pathologies cérébro-cardio-vasculaires [159]. Cette réserve repose sur des arguments biologiques et cliniques suggérant qu'ils puissent avoir des propriétés pro-thrombotiques. En effet, les coxibs n'ont aucune action sur la production de TXA_2 dépendante de COX-1 et ne diminuent donc pas les propriétés vasoconstrictrices, pro-agrégantes plaquettaires et promotrices de la prolifération musculaire lisse de ce médiateur. De plus,

comme ils inhibent la production vasculaire de prostacyclines (PGI_2), qui possèdent des propriétés vasodilatatrices, anti-agrégantes plaquettaires et anti-prolifératives sur les cellules musculaires lisses [144], les inhibiteurs sélectifs de COX-2 pourraient déséquilibrer la balance en faveur des eicosanoïdes pro-thrombogènes (TXA_2). A l'inverse, l'athérosclérose fait intervenir des processus inflammatoires et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 pourraient limiter ce processus en inhibant l'inflammation artérielle.

→ *Données avec le rofécoxib*

Les études 085 et 090 ont enrôlé 1042 et 978 sujets prenant soit 12,5 mg/j de rofécoxib, soit 1g de nabumétone, soit un placebo pendant six semaines pour le traitement d'une arthrose de genou. Les patients pouvaient prendre de l'aspirine. Ces études ont reporté une fréquence d'évènements cardio-vasculaires de 0,2% et 1,5% pour le rofécoxib ; 0,4 et 0,5% dans le groupe nabumétone et de 0 et 0,5% dans le groupe placebo, ce qui n'apporte pas d'information sur la thrombogénicité potentielle du rofécoxib. Pour ce qui est des effets indésirables rapportés, on attribue jusqu'en octobre 2000, 89 évènements thrombo-emboliques pour le rofécoxib, ce qui est négligeable par rapport au nombre de prescriptions.

L'étude VIGOR comparait l'incidence des effets indésirables gastro-intestinaux avec le rofécoxib 50 mg/j et le naproxène 1g/j au long cours chez des patients présentant une polyarthrite rhumatoïde. L'aspirine n'était pas permise dans l'étude, les patients nécessitant de l'aspirine pour des raisons cardiaques étant « théoriquement » exclus de l'étude [14]. 45/4047 patients dans le groupe rofécoxib et 20/4029 dans le groupe naproxène ont présenté durant l'étude un événement thrombotique (infarctus du myocarde, angor instable, thrombose cardique, arrêt cardiaque, mort subite, accident vasculaire cérébral ischémique et accident ischémique transitoire), ce qui correspond à un risque de développer un événement cardio-vasculaire plus de 2 fois supérieur avec le rofécoxib qu'avec le naproxène. Cependant, ce sur-risque disparaît quand sont exclus de l'analyse les sujets présentant des facteurs de risque

vasculaire, et devant donc théoriquement recevoir un anti-agrégant plaquettaire (présence ou absence d'antécédents d'accident vasculaire cérébral, d'accident ischémique transitoire, d'infarctus du myocarde, d'angor instable, d'angor, de pontage coronarien ou d'angioplastie coronarienne). Ce résultat montre que le rofécoxib, qui n'a pas d'activité anti-agrégante plaquettaire doit être associé à un anti-agrégant plaquettaire en présence de facteurs de risque vasculaire. A l'inverse, le naproxène qui induit une inhibition moyenne de 93% de l'agrégation plaquettaire (contre 92% chez les sujets sous 80 mg d'aspirine) pourrait avoir protégé d'un événement cardiovasculaire les patients de ce groupe ayant des facteurs de risque vasculaires non protégés avec de l'aspirine à faible posologie. L'hypothèse d'une effet anti-agrégant plaquettaire du naproxène est renforcée par le fait que les AINS proches tels que le flurbiprofène sont responsables d'une diminution de 70% de l'incidence de l'infarctus du myocarde contre placebo (Brochier-1993) et que l'indubufène est aussi efficace que l'aspirine pour prévenir l'occlusion des greffons saphène interne utilisés pour un pontage coronarien (Cataldo-1998).

L'hypothèse que le rofécoxib ne présente pas d'effet pro-thrombogène est renforcée par les résultats d'une étude récente qui montre que l'incidence des évènements cardiovasculaires chez des sujets présentant un ou plusieurs facteurs de risque vasculaire est comparable avec le rofécoxib, le placebo et 2 AINS classiques n'ayant pas d'effet inhibiteur significatif de la synthèse de thromboxane (diclofénac, ibuprofène). De plus, l'incidence d'évènements cardiovasculaires est trouvée plus faible sous naproxène que sous rofécoxib, placebo, diclofénac et ibuprofène, ce qui apporte un argument en faveur des propriétés anti-agrégantes plaquettaires du naproxène [118].

→ Données avec le célécoxib

L'étude CLASS était une étude en double aveugle randomisée dans laquelle 8059 personnes recevaient soit 400 mg de célécoxib deux fois/j, soit 800 mg d'ibuprofène deux fois/j, soit 75 mg de diclofénac deux fois/j [218]. L'aspirine (<325 mg/j) a été autorisée dans cette étude. Contrairement à l'étude VIGOR, cette étude n'a pas montré de différence significative entre les trois groupes en ce qui concerne l'incidence des complications cardiovasculaires. Ce résultat confirme l'hypothèse que les coxibs ne s'accompagnent pas d'un caractère pro-thrombogène propre et qu'il faut leur associer de l'aspirine en cas de risque cardiovasculaire. Cependant, en cas d'association à l'aspirine, l'étude CLASS a montré que la tolérance digestive n'est pas significativement améliorée sous célécoxib par rapport aux AINS comparateurs.

II.5.2. Risque rénal

Le rein est le site d'une production importante de prostaglandines. La démonstration en a été faite, dans un premier temps, par l'identification de PGE2 et de PGF2α par spectrométrie de masse et chromatographie dans les urines, puis par l'observation d'une augmentation ipsilatérale de la production de ces deux eicosanoïdes après injection d'arachidonate de sodium dans une artère rénale de chien. Il s'agit bien d'une production rénale de PGE_2 sous l'influence de l'arachidonate et non d'un passage urinaire de PGE_2 sanguin. L'équipe de Fröhlich a, par ailleurs, montré l'existence d'une augmentation de production ipsilatérale de PGE_2 et $PGF_{2\alpha}$ après injection artérielle rénale unilatérale d'angiotensine. De plus, quand des prostaglandines sont injectées par voie intra-veineuse, elles ne sont pas retrouvées dans les urines sous leur forme native, indiquant que leur clairance rénale est faible. On peut donc estimer grossièrement la synthèse rénale de prostaglandines en mesurant leurs concentrations urinaires, d'autant qu'elles sont supérieures aux concentrations sanguines. Les prostaglandines sont

essentiellement produites dans la médullaire et semblent cheminer vers le cortex où, dans le liquide tubulaire, elles seront mises en contact avec les artérioles glomérulaires.

Il est maintenant bien établi que COX-1 n'est pas seule impliquée dans la production rénale de prostaglandines vasodilatatrices. Ainsi, chez la souris, l'absence du gène codant pour COX-2 entraîne une dysplasie rénale sévère responsable d'un arrêt de maturation de la zone néphrogénique sous-capsulaire, à l'origine d'une néphropathie progressive avec l'âge et d'un décès prématuré [54, 155]. Les fœtus de souris ou rats exposés aux inhibiteurs sélectifs de COX-2 développent les mêmes anomalies, contrairement à l'exposition aux inhibiteurs de COX-1 [117]. COX-2 a été localisée dans les vaisseaux rénaux, la macula densa corticale, et dans les cellules interstitielles médullaires. Le contenu en COX-2 de ces régions augmente en outre avec l'âge. Inversement, COX-1 est présente dans les vaisseaux rénaux, les tubes collecteurs, et l'anse de Henlé [162].

La présence des 2 isoformes dans les vaisseaux rénaux suggère leur implication dans la production des prostaglandines vasodilatatrices, dont le rôle est crucial dans la préservation du débit sanguin rénal en présence d'une déplétion volémique.

La production urinaire de 11-déhydroxyTXB_2, un métabolite stable de TXB_2 est utilisé comme estimateur de l'activité systémique de COX-1 *in vivo* (pas seulement plaquettaire)[201]. La PGE_2 et le 6-kétoPGF$_{1\alpha}$ sont considérés comme le reflet de la production essentiellement rénale de PGE_2 et PGI_2 respectivement [185]. L'origine de la PGI-M urinaire (2,3 dinor 6-kétoPGF$_{2\alpha}$), qui est le produit de la β-oxydation du 6-kétoPGF$_{1\alpha}$ (lui-même dérivé de la PGI_2), reflèterait à la fois la production systémique et rénale de PGI_2, et ceci sans que l'on sache très bien la part respective des 2 sources [68]. La mesure de ces PG ne peut pas être utilisée pour établir le niveau de sélectivité d'inhibition des COXs, mais est utile pour étudier l'influence des différents AINS sur le métabolisme des PG rénales (PGE_2 et kétoPGF$_{1\alpha}$) et le métabolisme rénal et systémique de la prostacycline (PGI-M ou 2,3 dinor 6-kétoPGF$_{1\alpha}$).

La production urinaire de 11-déhydroxyTXB_2 est proche chez les patients ayant pris 25 mg de rofécoxib de celle du placebo alors qu'elle est réduite chez les patients prenant 15 mg par jour de méloxicam ou 150 mg de diclofénac, suggérant que le rofécoxib est le seul des 3 AINS à épargner significativement COX-1 [247]. Le rofécoxib (12,5 et 25 mg par jour), comme le méloxicam (15 mg par jour) et le diclofénac (150 mg par jour) inhibent significativement l'excrétion urinaire de 6-kétoPGF$_{1\alpha}$ et de 2,3 dinor 6-kétoPGF$_{1\alpha}$, ce qui suggère qu'une part substantielle de la PGI_2 dérive de COX-2. L'excrétion urinaire PGE_2 est aussi significativement diminuée, même avec le rofécoxib [247].

De manière étonnante, le retentissement des AINS inhibant sélectivement COX-2 sur la fonction rénale est assez mal connu.

Chez des sujets de 59 à 80 ans ne présentant pas de déplétion sodéee, l'administration de 50 mg de rofécoxib une fois par jour ou de 50 mg d'indométacine 2 fois par jour entraîne une diminution transitoire de l'excrétion sodée d'environ 20% mais ne provoque pas d'hypertension artérielle ou d'œdèmes. En parallèle, le niveau de filtration glomérulaire, mesurée après 14 jours diminue d'environ 5% dans le groupe indométacine mais n'est pas modifié dans le groupe rofécoxib ($p<0,005$) [25].

Au contraire, l'administration de 12,5 ou 25 mg de rofécoxib 1 fois par jour ou 50 mg d'indométacine 3 fois par jour diminue de façon comparable la filtration glomérulaire chez des sujets présentant une déplétion sodée [234].

L'analyse des données post-marketting du célécoxib a révélé l'apparition d'œdèmes chez 2,1% des patients, d'une hypertension artérielle dans 0,8% des cas et d'une aggravation d'une hypertension artérielle préexistante dans 0,6% des cas, c'est à dire des résultats proches de ceux observés avec les AINS classiques [257]. De manière similaire, l'analyse des données concernant le rofécoxib a montré que des œdèmes périphériques apparaissent chez 3,8% des patients recevant 25 mg de cette molécule par jour [258]. La co-prescription d'un inhibiteur de

l'enzyme de conversion de l'angiotensine et de célécoxib s'accompagne après 4 semaines de traitement d'une augmentation de la pression artérielle de 1,8 ± 1,4 mm Hg contre environ 5 mm Hg avec les AINS classiques [260]. Cependant, d'autres études suggèrent que le rofécoxib et le célécoxib ont les mêmes effets sur la pression artérielle que le naproxène [211]. L'analyse des données OMS sur les derniers mois de l'année 2000 suggère que le rofécoxib pourrait avoir une toxicité rénale supérieure au célécoxib [268]. En effet, le rofécoxib pourrait entraîner davantage de rétention hydrosodée (risque relatif de 1,97 pour le rofécoxib *vs* 1,18 pour le célécoxib), d'insuffisance rénale (risque relatif de 2,38 *vs* 0,7), d'insuffisance cardiaque (risque relatif de 2,22 *vs* 1,09) et d'hypertension (risque relatif de 2,39 *vs* 0,48). De plus, une étude randomisée à 6 semaines chez des patients arthrosiques de plus de 65 ans a montré que 9,5 % des patients sous rofécoxib *vs* 4,9 % sous célécoxib ont développé des oedèmes et que 17% des patients sous rofécoxib ont eu une augmentation de la pression artérielle systolique *vs* 11% sous célécoxib (2,3% vs 1,5% présentent une augmentation de la pression artérielle diastolique). Ainsi, à 6 semaines la modification moyenne de TA sous rofécoxib est de + 2,6 mm Hg contre –0,5 mm Hg sous célécoxib. Cette étude montre bien que les patients hypertendus doivent être suivis strictement après instauration d'un traitement par coxib, en particulier pour le rofécoxib, qui semble moins bien toléré que le célécoxib sur le plan rénovasculaire [69, 259].

II.5.3. Inflammation colique, cicatrisation d'ulcères gastroduodénaux et autres risques

COX-2 exerce un rôle dans la protection de la muqueuse digestive dans différentes situations d'agression. Par exemple, 3 heures après l'administration d'aspirine à un rat, on assiste à une expression d'ARN messager de COX-2 [41]. Une sur-expression d'ARN messager de COX-2 a été également observée dans de nombreuse autres situations d'agression du tube digestif, tels que l'ulcère gastroduodénal [153] ou dans des modèles murins de colites [197]. De

nombreuses études ont suggéré que l'augmentation des prostaglandines synthétisées *via* COX-2 joue un rôle dans les mécanismes de réparation tissulaire digestive. En effet, le NS-398, une inhibiteur sélectif de COX-2 retarde significativement la cicatrisation des ulcères gastriques chez le rat [153]. Des résultats similaires ont été observés dans différents modèles d'ulcères digestifs avec différents inhibiteurs de COX-2 (L747,337) et dans différents modèles de colites, les inhibiteurs de COX-2 entraînant retard de cicatrisation, exacerbation de la colite, et risque accru de perforation et de décès (197). Des résultats équivalents ont été observés dans des modèles de souris déficientes en COX-2, chez lesquelles l'administration de l'indométacine s'accompagne plus fréquemment de lésions sévères et de perforation intestinale que chez les souris sauvages [158, 252].

A la lumière de ces résultats, et en l'absence d'étude chez l'Homme qui démontre l'innocuité de leur emploi dans les situations de lésions et d'inflammation digestive, il est actuellement bien admis que les inhibiteurs sélectifs de COX-2 sont contre indiqués en cas d'ulcère gastroduodénal évolutif ou en cas de colite, quelle qu'en soit la nature.

Enfin, bien que plusieurs études fondamentales aient montré que COX-2 intervient dans l'ovulation [198], le remodelage osseux [186] et l'activité neuronale [28, 263], il n'existe pas à l'heure actuelle de précaution d'emploi particulière liée à ces rôles métaboliques.

Rev Méd Interne 2000 ; 21 : 978-88
© 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Tous droits réservés
S024886630000254X/REV

Mouvement thérapeutique

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives

H. Blain[1,2], J.Y. Jouzeau[2], P. Netter[2], C. Jeandel[1]*

[1]*Service de médecine interne C et gérontologie clinique, centre Antonin-Balmes, 39, avenue Charles-Flahaut, CHU, 34295 Montpellier cedex 5, France ;* [2]*laboratoire de pharmacologie et UMR CNRS-UHP 7561, faculté de médecine, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

(Reçu le 25 août 1999 ; accepté le 17 décembre 1999)

Résumé

Introduction. – Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) inhibent la production des prostanoïdes primaires en bloquant l'accès de l'acide arachidonique au site actif des cyclooxygénases (COX). Parce que les prostanoïdes produits par COX-1 semblent jouer un rôle physiologique (protection de la muqueuse gastrique, agrégation plaquettaire, homéostasie vasculaire, maintien de l'équilibre hydrosodé) tandis que ceux produits par COX-2 semblent intervenir principalement dans la réponse inflammatoire et dans quelques processus associés à la prolifération cellulaire, est née l'hypothèse que les AINS inhibant spécifiquement COX-2 pourraient théoriquement conserver les propriétés thérapeutiques des AINS tout en ayant moins d'effets indésirables grâce au maintien de la production de prostaglandines physiologiques.

Actualités et points forts. – Cette notion de sélectivité pour les isoenzymes de la COX a conduit à proposer une nouvelle classification des AINS : 1) les inhibiteurs sélectifs de COX-1 correspondant à l'aspirine à faible posologie ; 2) les inhibiteurs non sélectifs des COX correspondant à la majorité des AINS classiques ; 3) les inhibiteurs préférentiels de COX-2 correspondant au méloxicam, au nimésulide ; 4) les inhibiteurs sélectifs de COX-2 correspondant au célécoxib et au rofécoxib. Les premières études cliniques ont montré que les inhibiteurs sélectifs de COX-2 ont une efficacité comparable aux AINS classiques et une meilleure tolérance digestive, confirmant l'intérêt de cette nouvelle classification. Ces études ont conduit à la commercialisation au Royaume-Uni et aux États-Unis du rofécoxib dans le traitement de différents états douloureux et de la poussée aiguë d'arthrose, et du célécoxib aux États-Unis et dans d'autres pays dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et de la poussée d'arthrose.

Perspectives et projets. – Différentes études épidémiologiques et de laboratoire ont suggéré que les AINS pourraient réduire l'apparition de cancers (du côlon en particulier) et de la maladie d'Alzheimer en raison de leur activité inhibitrice des COX et en particulier de COX-2. L'intérêt des inhibiteurs spécifiques de COX-2 reste à être évalué dans ces indications, d'autant qu'ils pourraient par ailleurs retarder la cicatrisation des ulcères gastroduodénaux et gêner certains mécanismes physiologiques induits par COX-2. Cela suggère que ces nouveaux AINS devront probablement être utilisés avec prudence chez certaines populations de sujets. © 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

cyclooxygénases / anti-inflammatoires non stéroïdiens / cancer colorectal / Alzheimer (maladie d') / inhibition de COX-2

*Correspondance et tirés à part : C. Jeandel, même adresse.

Summary – Non-steroidal anti-inflammatory drugs with selective inhibitory activity on cyclooxygenase 2. Interest and future prospects.

Introduction. *– Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit the production of primary prostanoids by blocking the access of arachidonic acid to the active site of the cyclooxygenases (COXs). Because the prostanoids produced by COX-1 appear to play a physiological role (protection of the gastric mucosa, platelet aggregation, vascular homeostasis, maintenance of renal sodium-water balance) while those produced by COX-2 seem mainly to intervene in the inflammatory response and in certain processes associated with cell proliferation, the hypothesis has been put forward that the NSAIDs that are selective COX-2 inhibitors should theoretically be capable of maintaining NSAID therapeutic properties but also have fewer adverse side effects due to the maintenance of prostaglandin production at normal physiological levels.*

Current knowledge and key points. *– The hypothesis of COX isoenzyme selectivity has led to a proposed classification for COX inhibitors: 1) COX-1 selective inhibitors (low-dosage aspirin); 2) COX non-selective inhibitors (the majority of classified NSAIDs, which when administered over the long term, e.g., in cases of rheumatoid arthritis, cause duodenal ulcers in 20% of cases and gastric hemhorrage in 1-4% of cases/year); 3) COX-2 preferential inhibitors (meloxicam and nimesulide, which have fewer gastric side effects than standard NSAIDs, but which are not risk-free at high doses); 4) COX-2 selective inhibitors (celecoxib and rofecoxib). Preliminary clinical studies have shown that COX-2 selective inhibitors are as efficient as standard NSAIDs and have fewer adverse digestive side effects, thereby confirming the interest of this proposed classification. In the UK, the aforementioned studies have led to the commercialization of rofecoxib for the treatment of pain and osteoarthritis, while celecoxib has been introduced in medical practice in the USA and other countries for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis.*

Future prospects and projects. *– Various epidemiological and laboratory studies have indicated that NSAIDs may be able to reduce the risk of cancer (colorectal cancer in particular) and Alzheimer's disease due to their inhibitory activity on COXs, especially COX-2. The therapeutic contribution of COX-2 specific inhibitors has to be more fully evaluated, particularly as these agents could delay the healing of duodenal ulcers and interfere with several COX-2-induced physiological functions. It is therefore suggested that until further information becomes available, this new class of NSAIDs should be used with caution in certain patient populations.* © *2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS*

cyclooxygenase / NSAID / colorectal cancer / Alzheimer's disease / COX-2 inhibitor

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, que ce soit dans le contexte de la prescription médicale ou de l'automédication. Leurs propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques sont connues depuis la fin du siècle dernier et expliquent leur large utilisation à visée symptomatique. Certains AINS, et tout particulièrement l'aspirine, ont également des propriétés inhibitrices de l'agrégation plaquettaire qui en font un des traitements préventifs de la thrombose artérielle. Leur bénéfice thérapeutique est cependant limité par la survenue d'effets indésirables potentiellement graves, principalement digestifs (ulcères gastroduodénaux, hémorragie digestive) et à un moindre degré rénaux, qui font des AINS une des principales causes de maladie iatrogénique. On estime ainsi que 30 à 40 % des patients sous traitement par AINS prolongé auront un effet indésirable digestif sévère (ulcère gastroduodénal), devant faire arrêter leur prescription dans plus de 10 % des cas et que 1 à 2 % d'entre eux auront une complication de type hémorragie ou perforation digestive [1].

Cette quasi-impossibilité de dissocier les effets thérapeutiques des AINS de certains de leurs effets indésirables s'explique par leur mécanisme d'action. En effet, on sait depuis 1970 que les AINS inhibent la biotransformation en prostaglandine H_2 (PGH_2) de l'acide arachidonique issu des phospholipides membranaires, par une enzyme, la cyclooxygénase (COX). Cette inhibition rend impossible la transformation de PGH_2 en prostanoïdes par les isomérases

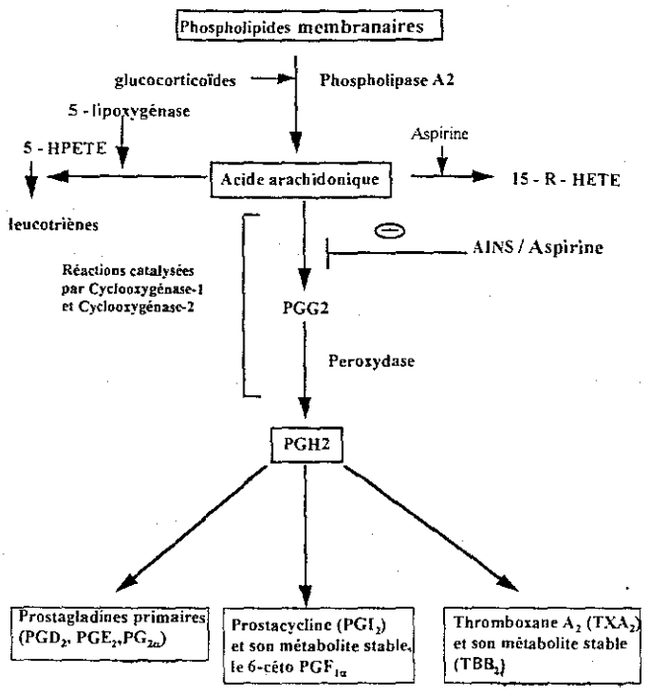


Figure 1. Représentation schématique de la biotransformation de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases (adapté de Dubois et al., 1998 [2]). 5-HPETE : acide 5-hydroperoxy-éicosatétraénoïque ; 15-R-HETE : acide 15-R-hydro-éicosatétraénoïque ; AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens ; PGH_2 : prostaglandine H_2.

spécifiques à la cellule (thromboxane B2 dans la plaquette sanguine, PGE_2 dans les monocytes, prostacycline dans l'endothélium en particulier) *(figure 1)*. Cette « théorie de la COX », qui a valu à Sir John Vane de recevoir le prix Nobel de médecine en 1982, est une hypothèse cohérente, eu égard aux propriétés ambivalentes des prostaglandines dans l'organisme. Ainsi, la production exagérée de prostaglandines en situation pathologique participe à l'inflammation (vasodilatation, augmentation de la perméabilité capillaire) et à la douleur (sensibilisation des nocicepteurs) alors que sa production basale permet l'homéostasie tissulaire (production de mucus, de bicarbonates et maintien du flux sanguin sous-muqueux gastrique, maintien de l'hémodynamique rénale en cas d'hypoperfusion en particulier). L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc, jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables et délétères.

CYCLOOXYGÉNASES 1 ET 2. DEUX ENZYMES AUX CARACTÉRISTIQUES STRUCTURALES PROCHES MAIS AUX PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES TRÈS DIFFÉRENTES

Depuis 1988, de nombreuses études ont permis de démontrer qu'il n'existe pas une, mais bien deux isoformes distinctes de COX [3-6], codées par des gènes différents [7] et dénommées COX-1 et COX-2. COX-1 et COX-2 présentent une grande similitude structurale, ce qui permet de comprendre leur inhibition conjointe par les AINS classiques, mais également quelques différences essentielles, présentées dans les *tableaux I* et *II*, qui permettent d'expliquer leurs rôles physiopathologiques distincts.

Tableau I. Principales différences entre les deux isoformes de COX (COX-1 et COX-2).

	COX-1	*COX-2*
Gène	22 kb, chromosome 9 ARNm 2,8 kb	8 kb, chromosome 1 ARNm 4,3 kb (instable)
Localisation	Réticulum endoplasmique (+++) Membrane nucléaire (+)	Réticulum endoplasmique (+) Membrane nucléaire (+++)
Substrats	Acide arachidonique (AA) AA exogène (synthétisé par PLA2 des cellules voisines	AA et autres acides gras en C20 AA exogène et endogène
Expression	Constitutionnelle, ubiquitaire, à niveau constant	Constitutionnelle (cerveau, prostate) Inductible en 1 à 3 heures dans tous les tissus par IL-1, IL-2, TNFα, les facteurs de croissance (EGF, FSD) et le LPS bactérien Inhibition par les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13)
Effets des glucocorticoïdes	Peu ou pas d'inhibition directe de l'activité enzymatique	Réduction de la transcription Blocage de la traduction de la protéine inductible
Effets de l'aspirine	Inhibition totale	Production de 15 R-HETE

LPS : lipopolysaccharide ; 15 R-HTE : acide 15-R-hydro-éicosatétrénoïque.

Tableau II. Principales fonctions biologiques des prostanoïdes produites par COX-1 et COX-2.

Tissu ou fonction (métabolites principaux)	*Effets des prostanoïdes synthétisés majoritairement par COX-1 (métabolites principaux)*	*Effets des prostanoïdes synthétisés majoritairement par COX-2 (métabolites principaux)*
Estomac (PGE_2, PGE_1)	Sécrétion de mucus, de bicarbonates	En cas d'inflammation, d'infection, d'ulcération ou d'adénocarcinome
	Maintien du flux sanguin sous-muqueux (vasodilatation)	Sécrétion de KCl
	Réépithélialisation	Cicatrisation ?
Tonus vasculaire et hémostase		
Plaquettes (TXB_2)	Agrégation plaquettaire et vasoconstriction	
Endothélium	Vasodilatation	
Rein (PGE_2, PGI_2)	Vaisseaux rénaux/glomérules	Macula densa/cellules interstitielles
Synthèse des PG en cas de diminution du débit rénal	Maintien du débit sanguin rénal (vasodilatation)	Production de rénine
Insuffisance cardiaque, rénale ou cirrhose hépatique		Rétrocontrôle tubuloglomérulaire (réabsorption sodée)
Système nerveux central (PGE_2, PGD_2)	Expression ubiquitaire, prédominant dans le cerveau antérieur	Cortex, hippocampe, hypothalamus
Cellules endothéliales		Maintien du débit sanguin cérébral ?
		Fièvre (synthèse de PGE_2 dans les vaisseaux perfusant l'hypothalamus si stimulation par LPS ou IL-1)
Neurones	Fonctions complexes d'intégration (modulation du système nerveux autonome et sensoriel en particulier	Développement, maturation et adaptation cérébrale à l'environnement
		Neurotransmission ?
		Mémorisation
		Apoptose neuronale en cas d'activité synaptique médiée par N-méthyl-D-aspartate (cf. maladie d'Alzheimer) ?
Cellules microgliales (en cas de stimulation par le LPS ou IL-1)		Défense et plasticité cérébrale ?
		Fièvre (synthèse de PGE_2)
		Moelle épinière (neurones sensoriels ou cellules non neuronales ?)
		Transmission nociceptive
Inflammation, arthrite (chondrocyte, synoviocyte)		Activité pro-inflammatoire
		Activité proalgésiante (sensibilisation des récepteurs périphériques)
Os	À l'état basal : résorption et formation osseuse ?	En cas de lésion osseuse : remodelage (ostéoblastes et cellules médullaires) ?
Utérus, ovaires (PGE_2, $PGF_{2\alpha}$)	Préimplantation de l'embryon dans l'endomètre	Ovulation (rupture du follicule)
	Maintien de la perméabilité du canal artériel ?	Nidation
		Contractions utérines ($PGF_{2\alpha}$)
Cancer (PGI_2)		Favorise la transformation des cellules épithéliales précancéreuses en cellules malignes
		Effet anti-apoptotique

PG : prostaglandines ; LPS : lipopolysaccharide.

COX-1 est exprimée constitutionnellement et de façon ubiquitaire. Elle exerce un rôle régulateur dans différents processus physiologiques, tels que la cytoprotection gastrique, l'hémostase primaire, l'homéostasie vasculaire et l'hémodynamique rénale.

Inversement, la COX-2 est une enzyme essentiellement inductible, qui n'est exprimée à l'état basal que dans de rares tissus comme la prostate et le cerveau. Le gène de COX-2 possède dans sa région promotrice des éléments de réponse à des facteurs de transcription activables par les facteurs de croissance et les cytokines pro-inflammatoires, ce qui explique son caractère inductible dans certaines circonstances. COX-2 participe ainsi à la régulation de diffé-

rentes réponses physiologiques sous contrôle hormonal (ovulation, nidation, travail utérin, métabolisme osseux, métabolisme hydrosodé) et est exprimée de façon quasi ubiquitaire en situation inflammatoire. De même, l'expression de COX-2 augmente dans le système nerveux central en réponse à différents stimulus périphériques, expliquant son rôle dans la transmission de la douleur et la fièvre.

VERS UNE NOUVELLE CLASSIFICATION DES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STÉROÏDIENS

La découverte des isoenzymes des COX a conduit à reconsidérer totalement la « théorie de la COX » de Vane et de proposer la « théorie des COX » avec la dichotomie suivante : une COX constitutive, COX-1, jouant un rôle physiologique (gastroprotection, agrégation plaquettaire, régulation de l'hémodynamique rénale...) et une COX inductible, COX-2, jouant un rôle dans la mitogenèse, la reproduction, l'inflammation et la douleur. Cette hypothèse a conduit l'industrie pharmaceutique à synthétiser des molécules inhibant sélectivement COX-2 dans l'espoir d'obtenir des anti-inflammatoires puissants, mais respectant la synthèse via COX-1 des prostanoïdes physiologiques, c'est-à-dire devant théoriquement posséder une tolérance digestive et rénale accrue et n'étant pas douées de propriété antiagrégante plaquettaire. Cette « théorie des COX » a conduit à proposer une nouvelle classification des AINS, faisant appel à la notion de sélectivité pour l'une ou l'autre COX, s'appuyant sur des critères enzymatiques, pharmacologiques et cliniques. Les quatre catégories proposées par le groupe international d'étude de COX-2 [8] sont :

– les inhibiteurs sélectifs de COX-1 correspondant à l'aspirine à faible posologie ;

– les inhibiteurs non sélectifs des COX correspondant à la majorité des AINS classiques, qui, donnés au long cours chez les sujets ayant une polyarthrite rhumatoïde, par exemple, entraînent l'apparition à terme d'un ulcère dans près de 20 % des cas et entraînent un saignement digestif dans 1 à 4 % des cas par an [9] ;

– les inhibiteurs préférentiels de COX-2 correspondent au méloxicam (Mobic®) et au nimésulide (Nexen®). La tolérance digestive est améliorée par rapport aux anti-inflammatoires classiques [10, 11]. Cependant, le risque d'effet indésirable digestif grave à type d'ulcère perforant ou de saignement n'est pas nul avec ces AINS, en particulier à posologie élevée [12] ;

– les inhibiteurs sélectifs de COX-2 : le célécoxib, qui est commercialisé par Monsanto Searle en partenariat avec Pfizer aux États-Unis, au Brésil, au Mexique, en Argentine et en Suisse sous le nom de Celebrex® (commercialisation prévue en France fin 2000) et le Rofécoxib®, commercialisé par Merk Frosst au Royaume-Uni et depuis peu en France sous le nom de Vioxx®, sont les deux représentants de cette classe. Les premiers résultats concernant la tolérance digestive du célécoxib et du rofécoxib sont très encourageants, montrant une fréquence d'ulcères endoscopiques à posologie utilisée dans la polyarthrite rhumatoïde comparable au placebo et l'absence d'activité antiagrégante à ces posologies élevées [13]. Ces résultats confirment l'intérêt de cette nouvelle classification des AINS.

AINS INHIBITEURS SÉLECTIFS DE COX-2 : INDICATIONS THÉRAPEUTIQUES AVÉRÉES ET POTENTIELLES

Douleur, arthrose et polyarthrite rhumatoïde : seules indications actuellement reconnues

Les AINS représentent une classe thérapeutique de choix dans le traitement de la douleur, en particulier postchirurgicale. Dans cette indication, leur action résulte d'une inhibition de la production de prostaglandines qui ont la propriété de sensibiliser les récepteurs nociceptifs périphériques [14] et de favoriser la transmission médullaire nociceptive [15]. Or, cette transmission nociceptive semble tout particulièrement impliquer les récepteurs spinaux du N-méthyl-D-aspartate (NMDA) par l'activation de COX-2 [16]. Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 semblent capables, tout comme l'indométacine (inhibiteur non sélectif de référence dans cette indication), d'inhiber la réponse centrale [15] et locale [17] à la douleur. Le rofécoxib a d'ores et déjà obtenu sa mise sur le marché au Royaume-Uni dans le traitement de différents états douloureux. Cependant, le célécoxib semble avoir des propriétés analgésiques inférieures à l'ibuprofène, expliquant qu'il n'ait pas d'autorisation de mise sur le marché aux États-Unis pour cette indication.

L'induction de COX-2 a été observée dans le tissu synovial de patients en cours de poussée arthrosique ou de polyarthrite rhumatoïde [18, 19]. Les résultats d'études cliniques avec le célécoxib et le rofécoxib suggèrent qu'ils peuvent avantageusement remplacer les AINS classiques en raison de propriétés anti-inflammatoires identiques et d'une tolérance gastrique accrue, même à posologie élevée [20, 21]. Ces études ont conduit à la mise sur le marché du célécoxib dans différents pays dont les États-Unis dans le traitement de l'arthrose et de la polyarthrite rhumatoïde et du rofécoxib, au Royaume-Uni pour le traitement de l'arthrose.

Si ces deux molécules n'ont pas d'autorisation sur le marché dans le traitement symptomatique de la fièvre au cours de certaines affections inflammatoires sévères non infectieuses, une étude récente a montré que le rofécoxib a des propriétés antipyrétiques équivalentes au diclofénac et à l'ibuprofène [22].

Intérêt potentiel des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Système nerveux central

Maladies cérébrovasculaires ischémiques et hémorragiques

Si l'intérêt de l'aspirine dans la prévention primaire et secondaire de l'accident vasculaire cérébral ischémique et de la maladie coronarienne est bien établi, l'intérêt potentiel des AINS en phase aiguë de l'accident vasculaire cérébral hémorragique et ischémique n'est suggéré que depuis peu.

Parce qu'ils sont capables d'inhiber la production d'éicosanoïdes vasoconstricteurs [23], l'utilisation d'AINS dans la prévention du vasospasme après une hémorragie méningée paraît séduisante. Les AINS inhibant sélectivement COX-2, et cela d'autant qu'ils ne présentent pas d'effet antiagrégant plaquettaire, pourraient avoir un intérêt dans cette indication. Cependant, aucune étude clinique ne permet à l'heure actuelle de conclure à leur efficacité dans cette indication.

L'œdème cérébral vasogénique délétère qui apparaît dans les suites immédiates d'un accident ischémique cérébral est induit majoritairement par les prostaglandines [2], les leucotriènes et le thromboxane [24]. L'utilisation combinée d'un inhibiteur de la lipo- et de la cyclooxygénase (BW755C) lors de la reperméabilisation vasculaire semble minorer l'œdème cérébral et les lésions de reperfusion [25]. Donnés en phase aiguë de l'infarctus cérébral, les AINS pourraient permettre d'en réduire la taille [26] en inhibant la production de médiateurs inflammatoires (le glutamate en particulier) qui, en plus d'être toxiques pour les neurones avoisinants, induiraient l'expression des COX. Cette hypothèse semble confirmée par deux études qui montrent que les AINS inhibiteurs non sélectifs de COX-2 (indométacine ou ibuprofène) réduisent la mort neuronale en périphérie de la zone ischémiée en minorant la production de radicaux libres et de dérivés de l'acide arachidonique [27, 28].

Or COX-2 est particulièrement surexprimée dans les polynucléaires, les cellules vasculaires et les neurones en périphérie de la zone cérébrale ischémiée, ce qui indique son rôle potentiel dans l'apparition de l'œdème périlésionnel [29]. Si les arguments biologiques ne manquent pas pour suggérer l'intérêt des AINS et en particulier des AINS inhibant sélectivement COX-2 (d'autant plus intéressants que n'étant pas doués de propriétés antiagrégantes plaquettaires, ils n'induiraient pas de transformation hémorragique de la zone ischémiée), aucune étude épidémiologique n'a démontré leur intérêt clinique dans cette indication.

Démence sénile de type Alzheimer

L'action protectrice des AINS envers la démence sénile de type Alzheimer a été évoquée à travers différentes études épidémiologiques [30]. Les AINS semblent réduire le risque de développer la maladie dans la population générale [31, 32], et cela de façon corrélée avec leur durée d'utilisation [32]. Ils semblent retarder l'âge de début de la maladie dans les familles à risque et ralentir la dégradation cognitive des malades [33]. Or, ce risque relatif plus faible est observé lors d'un traitement par AINS classiques à posologie anti-inflammatoire (inhibition de COX-1 et COX-2) alors que l'aspirine, à posologie antiagrégante plaquettaire (inhibition sélective de COX-1) n'a pas cette propriété, suggérant l'intérêt de l'inhibition sélective de COX-2 dans cette maladie. Cette hypothèse s'appuie aussi sur des données biologiques montrant le rôle proapoptotique neuronal de COX-2, son effet générateur de radicaux libres neurotoxiques et son rôle dans l'activation microgliale, qui semble cruciale dans le développement de la maladie. Pourtant, si les AINS semblent réduire le

risque de développer une maladie d'Alzheimer, probablement en jouant un rôle sur la composante inflammatoire de la maladie, ils n'ont aucune efficacité sur le mécanisme causal de la neurodégénérescence [34]. Les études concernant le rofécoxib (deux études de phase II pour estimer si la molécule est capable de prévenir ou retarder l'apparition des symptômes de la démence sénile de type Alzheimer chez des sujets ayant des troubles cognitifs modérés ou de retarder l'évolution de la démence sénile de type Alzheimer quand elle est diagnostiquée) et le célécoxib (une étude commencée depuis deux ans évaluant l'intérêt de la molécule quand le diagnostic de démence sénile de type Alzheimer est posé) devraient permettre rapidement d'évaluer l'intérêt des inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans cette indication.

Autres maladies neurologiques

Les COX sont impliquées dans une grande variété de maladies neurologiques.

Les AINS présentent une grande efficacité dans le traitement des migraines simples [35]. L'expression de COX-2 induite lors d'une migraine accompagnée de déficits neurologiques [36] peut être inhibée par les AINS et les inhibiteurs de la synthèse de NO [37], suggérant l'intérêt des AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans cette indication.

Les AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2 pourraient avoir un intérêt dans certains types de maladies neurologiques traumatiques ou inflammatoires, qu'elles soient périphériques [38], médullaires ou centrales telles que la sclérose en plaque [39]. Une autre de leur indication potentielle est l'encéphalopathie du virus de l'immunodéficience acquise (VIH) [40, 41] où il existe une augmentation des taux de PGE_2, PGF_2 et TXB_2 dans le liquide céphalorachidien, corrélée par ailleurs à l'altération neurologique [42].

Les COX pourraient participer à la physiopathologie de la maladie de Parkinson en induisant la production de radicaux libres toxiques pour les neurones dopaminergiques. In vitro, l'activité hydroperoxydasique des COX peut en effet catalyser l'oxydation de la dopamine en dopamine quinones, cette réaction pouvant être inhibée par l'indométacine [43, 44]. À notre connaissance, le rôle de COX-2 n'a pas été étudié dans cette maladie.

Adénome et cancer colorectal

Les AINS tels que l'indométacine, le sulindac ou le piroxicam ont montré leur capacité à réduire le risque de développement d'une tumeur colique après induction par différents carcinogènes chez les muridés, l'effet étant suspensif à l'arrêt de l'AINS [45]. Plusieurs études chez l'homme ont montré que la prise régulière d'aspirine ou d'autres AINS entraîne une réduction du risque de cancer colique [46] et une régression des adénomes existants chez les patients ayant une polypose familiale [47].

Plusieurs études suggèrent que la production de prostaglandines par COX-2 participe à la genèse [48] et à la progression du cancer colique. Les tumeurs colorectales expriment en grande quantité COX-2 alors que la muqueuse saine en est incapable [49]. Les inhibiteurs de COX-2 protègent de la polypose intestinale les souris prédisposées génétiquement (délétion du gène antitumoral APC) [50]. Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 semblent capables in vitro et in vivo de réduire la croissance de cellules cancéreuses coliques [51, 52], d'inhiber la tumorogenèse des cellules épithéliales en réduisant leur adhésion à la matrice extracellulaire et en favorisant leur apoptose [53, 54], et de réduire l'angiogenèse induite par la tumeur [55].

Le mode d'action des AINS ne s'exerce pas seulement en bloquant la synthèse des prostaglandines. Les AINS peuvent en effet affecter le cycle cellulaire des cellules mammaires qui n'expriment pas les COX et ne produisent donc pas de prostaglandine [56, 57]. Ce mode d'action indépendant des COX pourrait expliquer que les AINS, tels que le sulindac et l'aspirine qui inhibent peu ou pas COX-2, présentent aussi une activité antiproliférative [58]. Les AINS pourraient induire l'apoptose cellulaire tumorale par des mécanismes indépendants de p53 et partiellement indépendants d'APC [59, 60].

Les AINS semblent enfin jouer un rôle dans la surveillance immune antitumorale. PGE_2, qui est exprimée en grande quantité dans le cancer colique, a la propriété d'inhiber l'expression par les cellules néoplasiques des molécules HLA de classe II, qui permettent aux leucocytes de les reconnaître et de les détruire. En induisant l'expression de ces molécules de reconnaissance, les AINS favoriseraient l'immunité antitumorale [61].

Si l'effet des AINS sur les adénomes coliques est indéniable [62], le traitement de choix pour le polype

unique reste actuellement la polypectomie, et le traitement de la polypose colique familiale reste la colectomie totale en raison des effets indésirables potentiels d'un traitement anti-inflammatoire au long cours [63]. De plus, le traitement par AINS ne dispense pas de la surveillance endoscopique répétée, car il n'annule pas totalement le risque de dégénérescence des polypes [64].

Les résultats des études déterminant le rapport risque/bénéfice, le coût, la posologie et la durée optimale de prescription des AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans la chimioprévention des tumeurs coliques, et les résultats de travaux évaluant l'intérêt des AINS en complément du traitement habituel des tumeurs coliques permettront de mieux situer la place des AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans le traitement préventif et curatif du cancer colique.

Cancers de l'œsophage, de la vessie et autres cancers

Plusieurs études épidémiologiques ont montré une réduction du risque de développer un cancer de l'œsophage par les AINS. COX-2 semble jouer un rôle dans le développement tumoral et les inhibiteurs sélectifs de COX-2 semblent pouvoir réduire la croissance tumorale gastrique par induction apoptotique [65, 66]. Une étude est en cours dans cette indication avec le célécoxib ainsi que dans le cancer de la vessie.

Si l'expression de COX-2 semble pouvoir en outre être impliqué dans la genèse de différents autres cancers, en particulier les adénocarcinomes pulmonaires [67], pancréatiques [68], hépatiques [69], gastriques [70] et le carcinome à cellules squameuses de l'œsophage [71], l'intérêt des inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans ces indications n'a pas fait l'objet d'études cliniques.

Enfin, une étude récente chez la souris a démontré une réduction dose-dépendante de la prolifération de tumeurs cutanées induites par les rayons ultraviolets sous célécoxib, suggérant l'intérêt potentiel des inhibiteurs sélectifs de COX-2 dans la prévention des cancers cutanés chez l'homme [72].

Intoxication et sevrage éthylique

De façon plus anecdotique, l'administration aiguë ou chronique d'alcool tout comme le sevrage d'alcool induit l'expression de COX-2 dans différentes zones cérébrales, en particulier corticales chez le rat. De plus, cette surexpression est accompagnée d'une hyperexcitabilité des récepteurs NMDA, suggérant le rôle de COX-2 dans certains effets aigus et chroniques de la consommation alcoolique [73].

RÉSERVES QUANT À L'UTILISATION DES INHIBITEURS SÉLECTIFS DE COX-2

Un certain nombre de réserves doivent cependant être émises avant l'utilisation larga manu des AINS inhibiteurs sélectifs de COX-2, d'autant plus que les nouvelles molécules bloquent très spécifiquement COX-2. En effet, COX-2 intervient dans de nombreux processus physiologiques, tels que l'ovulation [74], le remodelage osseux [75], la grossesse [76], l'activité neuronale [77, 78] et rénale [79-81], et la cicatrisation muqueuse gastrique après un ulcère [82]. Le retentissement sur ces processus physiologiques des AINS inhibant sélectivement COX-2 est en cours d'investigation. Ces données doivent d'autant plus imposer la prudence que l'absence du gène codant pour COX-2 entraîne chez la souris une néphropathie progressive avec l'âge et un décès prématuré [80, 81]. Il n'est pas exclu que, comme dans le cas des souris déficientes en COX-2, COX-1 puisse prendre le relais en cas d'inhibition durable de COX-2 [82]. Enfin, il ne faut pas perdre de vue que certains des effets indésirables des AINS (réaction allergique, par exemple) peuvent survenir indépendamment de leur niveau de sélectivité pour les COX. Compte tenu du succès retentissant du célécoxib depuis sa mise sur le marché (279 millions de dollars de chiffre d'affaires pour le premier trimestre 1999), les autorités de tutelle disposeront bientôt de données épidémiologiques suffisantes pour permettre de confirmer ou d'infirmer la meilleure tolérance digestive et le retentissement sur différentes fonctions physiologiques des inhibiteurs sélectifs de COX-2.

CONCLUSION

La découverte récente des deux isoenzymes COX-1 et COX-2 constitue une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes d'action des AINS (inhibition de COX-1 potentiellement responsable de leur effet antiagrégant et de leurs effets indésirables gastriques et inhibition de COX-2 responsable de leurs propriétés anti-inflammatoires et analgésiques). Cette notion de sélectivité pour les isoenzymes de la

Pour la thèse de Hubert BLAIN,

Il n’y a pas de page 986.

27 Joshita H, Asano T, Hanamura T, Takakura K. Effect of indomethacin and free radical scavenger on cerebral blood flow and edema after cerebral artery occlusion in cats. Stroke 1989 ; 20 : 788-94.
28 Patel P, Drummond J, Sano T, Cole D, Kalkman C, Yaksh T. Effect of ibuprofen on regional eicosanoid production and neuronal injury after forebrain ischemia in rats. Brain Res 1993 ; 614 : 315-24.
29 Iadecola C, Forster C, Nogawa S, Clark HB, Ross ME. Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia. Acta Neuropathol 1999 ; 98 : 9-14.
30 McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease : a review of 17 epidemiologic studies. Neurology 1996 ; 47 : 425-32.
31 Doraiswamy P, Krishen A, Stallone F, Martin W, Potts N, Metz A, et al. NSAIDs and cognition in Alzheimer's disease. Neurology 1996 ; 47 : 1194 p.
32 Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. Neurology 1997 ; 48 : 626-32.
33 Rogers J, Kirby L, Hempelman S, Berry D, McGeer P, Kasznaik A, et al. Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. Neurology 1993 ; 43 : 1609-11.
34 Blain B, Jouzeau JY, Blain A, Tréchot P, Touchon J, Netter P, et al. Maladie d'Alzheimer et anti-inflammatoires non stéroïdiens sélectifs de COX-2. Justification et perspectives. Presse Méd 2000 ; 29 : 267-73.
35 Pfaffenrath V, Scherzer S. Analgesics and NSAID in the treatment of the acute migraine attack. Cephalalgia 1995 ; 15 : 14-20.
36 Caggiano AO, Kraig RP. Eicosanoids and nitric oxide influence induction of reactive gliosis from spreading depression in microglia but not astrocytess. J Comp Neurol 1996 ; 369 : 93-108.
37 Meng W, Colonna DM, Tobin JR, Busija DW. Nitric oxide and prostaglandins interact to mediate arteriolar dilatation during cortical spreading depression. Am J Physiol 1995 ; 269 Suppl H : 176-81.
38 Miyamoto K, Oka N, Kawasaki T, Satoi H, Akiguchi I, et al. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitor on experimental allergic neuritis. Neuroreport 1998 ; 13 : 2331-4.
39 Hofman FM, von Hanwehr RI, Dinarello CA, Mitzel SB, Hinton D, Merrill JE. Immunoregulatory molecules and Il-2 receptors identified in multiple sclerosis brain. J Immunol 1986 ; 136 : 3239-45.
40 Dickson D, Lee S, Mattiace L, Yen SH, Brosnan C. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. Glia 1993 ; 7 : 75-83.
41 Lipton SA. Aids-related dementia and calcium homeostasis. Ann N Y Acad Sci 1994 ; 747 : 205-24.
42 Griffin DE, Wesselingh SL, McArthur JC. Elevated central nervous system prostaglandins in human immunodeficiency virus-associated dementia. Ann Neurol 1994 ; 35 : 592-7.
43 Hastings TG. Enzymatic oxidation of dopamine : the role of prostaglandin H-synthase. J Neurochem 1995 ; 64 : 919-24.
44 Mattammal MB, Strong R, Lakshmi VM, Chung HD, Stephenson AH. Prostaglandin H synthetase-mediated metabolism of dopamine : implication of Parkinson's disease. J Neurochem 1995 ; 64 : 1645-54.
45 Thun MJ. NSAID use and decreased risk of gastrointestinal cancers. Gastroenterol Clin North Am 1996 ; 25 : 333-48.
46 Smalley W, Dubois RN. Colorectal cancer and non steroidal anti-inflammatory drugs. Adv Pharmacol 1997 ; 39 : 1-20.
47 Giardiello FM, Offerhaus GJA, Dubois RN. The role of nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal cancer prevention. Eur J Cancer 1995 ; 31 Suppl A : 1071-6.
48 Gustafson-Svard C, Lilja I, Hallbook O, Sjodahl R. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenocarcinomas and in azomethane induced colonic tumours in rats. Gut 1996 ; 38 : 79-84.
49 Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, White RL, Prescott SM. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer : evidence for a transcriptional effect. Proc Natl Acad Sci USA 1996 ; 93 : 4816-20.
50 Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc716 knochout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). Cell 1996 ; 87 : 803-9.
51 Reddy BS, Hirose Y, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Paulson S, et al. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administred during different stages of carcinogenesis. Cancer Res 2000 ; 60 : 293-7.
52 Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey R, Morrow J, et al. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. J Clin Invest 1997 ; 99 : 2254-9.
53 Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. Cell 1995 ; 83 : 493-501.
54 Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. Cancer Res 1998 ; 58 : 409 p.
55 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, Dubois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 1998 ; 93 : 705-16.
56 Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Staiano-Coico L, Shiff SJ, et al. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. Biochem Pharmacol 1996 ; 52 : 237-45.
57 Thompson HJ, Jiang C, Lu JX, Mehta RG, Piazza GA, Paranka NS, et al. Sulfone metabolite of sulindac inhibits mamary carcinogenesis. Cancer Res 1997 ; 57 : 267-71.
58 Piazza GA, Alberts DS, Hixson LJ, Paranka NS, Li H, Finn T, et al. Sulindac sulfone inhibits azomethane-induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels. Cancer Res 1997 ; 57 : 2909-15.
59 Elder DJE, Hague A, Hicks DJ, Paraskeva C. Differential growth inhibition by the aspirin metabolite salicylate in human colorectal tumor cell lines : enhanced apoptosis in carcinoma cell lines. Cancer Res 1996 ; 56 : 2273-6.
60 Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1996 ; 93 : 7950-4.
61 Arvind P, Qiao L, Papavassiliou ED, Goldin E, Koutsos M, Rigas B. Aspirin and aspirin-like drugs induce the expression of HLA-DR in HT29 colon adenocarcinoma cells. Int J Oncol 1996 ; 8 : 1207-11.
62 Waddell WR, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. J Surg Oncol 1983 ; 24 : 83-7.
63 Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. N Engl J Med 1995 ; 333 : 609-14.
64 Thorson AG, Lynch HT, Smyrk TC. Rectal cancer in FAP patients after sufindac [letter]. Lancet 1994 ; 343 : 180 p.
65 Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, et al. Cyclooxygenase-2 expression in human oesophageal carcinoma. Cancer Res 1999 ; 59 : 198-204.
66 Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. Am J Physiol 1998 ; 274 (6Ptl) : G1061-7.
67 Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vaino H, Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. Cancer Res 1998 ; 58 : 4997-5001.

68 Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, Tsujie M, Kondo M, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. Clin Cancer Res 1999 ; 5 : 2018-24..
69 Shiota G, Okubo M, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, et al. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenteroly 1999 ; 46 : 407-12.
70 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. J Surg Oncol 1998 ; 69 : 168-72.
71 Ratnasinghe D, Tangrea J, Roth MJ, Dawsey S, Hu N, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human squamous cell carcinoma of the esophagus; an immunohistochemical survey. Anticancer Res 1999 ; 19 : 171-4.
72 Fisher SM, Lo HH, Gordon GB, Seibert K, Kelloff G, Lubet RA, Conti CJ. Mol Carcinog 1999 ; 25 : 231-40.
73 Knapp DJ, Crews FT. Induction of cyclooxygenase-2 in brain during acute and chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal. Alcohol Clin Exp Res 1999 ; 23 : 633-43.
74 Richards JS, Fitzpatrick SL, Clemens JW, Morris JK, Alliston T, Sirois J. Ovarian cell differenciation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. Rec Prog Hormone Res 1995 ; 50 : 223-54.
75 Pealbeam CC, Fall PM, Alander CB, Raisz LG. Differential effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on constitutive and inducible prostaglandin G/H synthase in cultures bone cell. J Bone Miner Res 1997 ; 12 : 1198-203.
76 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 : 107-22.
77 Yamagata K, Anderasson KI, Kaufmann WE, et al. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neuron: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. Neuron 1993 ; 11 : 371-86.
78 Chen J, Marsh T, Zhang JS, et al. Expression of cyclooxygenase 2 in rat brain following kainate treatment. Neuroreport 1995 ; 6 : 245-8.
79 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 : 2504-10.
80 Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, et al. Prostaglandin synthase 2 disruption causes severe renal pathology in the mouse. Cell 1995 ; 83 : 473-82.
81 Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, et al. Renal abnormalities and an alterated inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase 2. Nature 1995 ; 273 : 406-9.
82 Kirtikara K, Morham SG, Raghow R, Laulederkind SJ, Kanekura T, Goorha S, et al. Compensatory prostaglandin E2 biosynthesis in cyclooxygenase 1 or 2 nuff cells. J Exp Med 1998 ; 187 : 517-23.

Anti-inflammatoires non stéroïdiens sélectifs de la cyclooxygénase-2 pour la maladie d'Alzheimer

Justification et perspectives

H. Blain, J.Y. Jouzeau, A. Blain, B. Terlain, P. Tréchot, J. Touchon, P. Netter, C. Jeandel

L'ESSENTIEL

■ **Une pathologie cérébrale dégénérative à composante inflammatoire probable :** En témoigne la présence, au pourtour des plaques séniles matures et des dégénérescences neurofibrillaires, de cellules astrogliales activées synthétisant des médiateurs inflammatoires (fractions du complément, cytokines et prostaglandines en particulier) potentiellement neurotoxiques.

■ **Emploi des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) :** Sa justification théorique, bien qu'actuellement non formellement démontrée, repose sur les résultats de plusieurs études épidémiologiques montrant un risque relatif plus faible de développer une maladie d'Alzheimer (MA) chez les patients traités au long cours par AINS, qui sont des inhibiteurs non sélectifs de la biotransformation de l'acide arachidonique en prostaglandines par les cyclo-oxygénases 1 et 2 (COX).

■ **Emploi d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 :** Sa justification théorique repose :
– sur les résultats d'études épidémiologiques montrant un risque relatif plus faible de développer une MA lors d'un traitement par AINS classiques à posologie anti-inflammatoire (inhibition de COX-1 et COX-2) alors que l'aspirine, à posologie anti-agrégante plaquettaire (inhibition sélective de COX-1) n'a pas cette propriété,
– sur les résultats d'études fondamentales,
– sur l'observation d'une moindre prévalence d'effets indésirables digestifs graves avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2 qu'avec les AINS classiques, suggérant la possibilité de leur prescription au long cours dans cette indication potentielle.

■ **Considérations à prendre en compte :** COX-2 aurait une ambivalence fonctionnelle dans le cerveau :
– la production de prostaglandines via COX-2 pourrait participer à la physiologie neuronale et l'expression de COX-2 est associée au développement cérébral.
– Les AINS classiques ne réduisent pas la formation des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires dans la MA. Ceci suggère qu'ils agissent sur la composante inflammatoire de la maladie (activation microgliale) mais qu'ils n'ont aucun effet sur le mécanisme causal de la neurodégénérescence.
– L'utilisation prophylactique des inhibiteurs sélectifs de COX-2 peut être prise en considération sur la base de leur bonne tolérance digestive après 6 mois d'utilisation aux USA mais doit être confirmée à plus long terme.
Les études cliniques de l'efficacité d'une inhibition sélective de COX-2 dans la MA sont en cours avec le célécoxib et le rofécoxib.

***Presse Med* 2000 ; 29:267-73**
© 2000, Masson, Paris

MAIN POINTS

Alzheimer's disease and non steroidal anti-inflammatory drugs with selectivity for cyclo-oxygenase-2: Rationale and perspectives

■ **Possible inflammatory mechanisms:** Alzheimer's disease (AD) is a degenerative disease of the brain including possibly inflammatory mechanisms, as illustrated by the presence of activated microglial cells in the periphery of senile plaques and neurofibrillary tangles and the subsequent release of pro-inflammatory mediators with neurotoxic potency.

■ **Rationale for NSAID use:** Although not firmly demonstrated, the rationale for the prescription of non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as neuroprotective agents in AD lies on epidemiological data having shown a reduced risk of developing AD in patients on long-term therapy with NSAIDs (non selective cyclo-oxygenase [COX] inhibitors),

■ **Rationale for the use of selective COX-2 inhibitors:** The rationale for the prescription of selective COX-2 inhibitors as neuroprotective drugs in AD lies on:
– Epidemiological data having shown a reduced risk of developing AD in patients treated with anti-inflammatory doses of classical NSAIDs (inhibition of COX-1 and COX-2) but not with antithrombotic doses of aspirin (selective inhibition of COX-1),
– Cellular experiments,
– Demonstration of a better gastro-intestinal (GI) safety profile with selective COX-2 inhibitors than with classical NSAIDs in short-term studies, allowing a possible long-term use in AD.

■ **Before prescribing:** COX-2 may have an ambivalent functionality in the brain since the basal production of prostaglandins through COX-2 may participate in neuronal homeostasis whereas the expression of COX-2 is associated with brain development. Classical NSAIDs are ineffective in reducing the formation of senile plaque and neurofibrillary tangles in AD, which is consistent with an ability to reduce inflammation associated with activation of microglia but illustrates their failure to suppress the degenerative process. Prophylactic use of selective COX-2 NSAIDs can be considered on the basis of their good GI safety after 6 months of marketing in United States but need to be confirmed for a longer time.

■ **Current trials:** Clinical studies focusing on both the prevention and the slowing down of early AD are under way with two recently launched selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib.

H. Blain, J.Y. Jouzeau, A. Blain et al.

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie cérébrale dégénérative, responsable de l'affaiblissement progressif de l'ensemble des fonctions cognitives, conduisant à terme à une perte totale de l'autonomie des sujets atteints. L'avancée en âge, qui représente le principal facteur de risque de la MA, rend compte de l'augmentation préoccupante de son incidence dans les pays industrialisés.

La MA est caractérisée par 3 types de lésions histopathologiques prédominant dans l'hippocampe, l'amygdale et diffusant progressivement au cortex cérébral associatif : les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), les plaques séniles neuritiques et la réduction synaptique. Les DNF sont des enchevêtrements neurofibrillaires intraneuronaux constitués de filaments en double hélice (« paired helical filaments » ou PHF). Leur principal constituant est la protéine tau anormalement phosphorylée, dont les propriétés fonctionnelles, comme l'assemblage et la stabilisation des microtubules du cytosquelette neuronal et le transport axoplasmique des protéines synthétisées dans le corps cellulaire, sont altérées. Les plaques séniles neuritiques extracellulaires (diffuses ●●●

Service de Médecine Interne-Gériatrie C (HB, CJ), Centre de Gérontologie Médicale Antonin Balmes, Unité de Neurologie Comportementale (JT), CHU de Montpellier.
Laboratoire de Pharmacologie & UMR CNRS-UHP 7561 (HB, JYJ, BT, PN), Faculté de Médecine, Vandœuvre-Lès-Nancy.
Centre Régional de Pharmacovigilance, Hôpital Central (AB, PT, PN), Nancy.
Correspondance : C. Jeandel, Service de Médecine interne-Gériatrie C, Centre de Gérontologie Médicale Antonin Balmès, F 34295 Montpellier Cedex.
Reçu le 21 avril 1999 ; accepté le 3 août 1999.

ou fibrillaires) et les dépôts amyloïdes vasculaires sont tous 2 constitués majoritairement d'un peptide ß-amyloïde (Aß) défini par sa conformation plissée en feuillets ß et issu du catabolisme d'un précurseur protéique nommé APP (Amyloid Protein Precursor). La réduction synaptique semble intimement liée à la présence de DNF et de l'activation astrogliale au sein des plaques neuritiques.

Si la physiopathologie de la maladie demeure encore inconnue, l'analyse des constituants des plaques séniles et des DNF plaide en faveur de la participation de phénomènes inflammatoires qui peuvent être à l'origine ou au contraire la conséquence de la neurodégénérescence. Cette hypothèse est corroborée par l'observation d'une réduction possible du risque de développer la maladie chez les consommateurs au long cours d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

Les AINS empêchent la liaison de l'acide arachidonique (issu de l'hydrolyse des phospholipides membranaires par les phospholipases A2 (PLA2) au site actif des cyclooxygénases (COX) et inhibent ainsi la production de prostaglandines (PG) [1]. L'identification récente de 2 isoenzymes de la cyclooxygénase a permis une grande avancée dans la compréhension des effets thérapeutiques et indésirables des AINS. En effet, si la production basale de PG *via* COX-1 joue un rôle dans l'agrégation plaquettaire et dans l'homéostasie rénale et digestive, la production stimulée de PG *via* COX-2 sous l'effet de médiateurs de l'inflammation, d'hormones ou de facteurs de croissance participe aux processus inflammatoires. Cette dichotomie a conduit l'industrie pharmaceutique à chercher des molécules inhibant sélectivement COX-2, dans le but d'obtenir des AINS aussi efficaces mais bénéficiant d'une tolérance digestive et peut-être rénale accrue. Deux molécules inhibant préférentiellement COX-2 sont actuellement commercialisées en France [meloxicam (Mobic) et nimésulide (Nexen)]. D'autres molécules dont le célécoxib et le rofécoxib, qui sont des inhibiteurs sélectifs de COX-2, viennent d'obtenir leur autorisation de mise sur le marché respectivement aux Etats-Unis, au Brésil, au Mexique, en Argentine, en Suisse, en Allemagne et en Suède sous le nom de Celebrex et aux Etats-Unis et au Royaume-Uni sous le nom de Vioxx [2, 3]. Parce que COX-2 pourrait jouer un rôle physiopathologique dans la MA et que les inhibiteurs sélectifs de COX-2 semblent présenter une meilleure tolérance digestive que les AINS classiques, seul compatible avec une prescription au long cours, cette nouvelle sous-classe d'AINS (les coxib) pourrait présenter un intérêt thérapeutique en intervenant sur la composante inflammatoire de la MA. Ils sont cependant dénués d'action sur l'origine de la dégénérescence neuronale. Les études en cours concernant l'intérêt du célécoxib et du rofécoxib dans la prévention et l'évolution de la MA seront, à ce titre, déterminantes.

INFLAMMATION ET MALADIE D'ALZHEIMER. LES DIFFÉRENTS INTERVENANTS

De nombreuses études suggèrent que la MA est une pathologie dégénérative chronique à composante inflammatoire [4]. La présence, chez les sujets atteints de MA, de cellules inflammatoires, qu'il s'agisse de macrophages (microglie activée/macrophages) et d'astrocytes activés, dans les plaques séniles neuritiques et les vaisseaux mais également dans certaines zones hippocampiques dénuées de plaques séniles plaide en faveur de cette hypothèse [5]. Les cellules microgliales trouvées dans les plaques séniles neuritiques de la MA, contrairement à celles présentes dans les plaques séniles de sujets normaux, sont activées comme l'atteste l'expression à leur surface de glycoprotéines du complexe d'histocompatibilité, de récepteurs du complément et de cytokines [6]. La microglie activée synthétise notamment des molécules inflammatoires telles que les protéines activées du complément [7], certaines cytokines [Interleukine (IL)-1, IL-6, Tumor Necrosis Factor α (TNFα), Interferon γ (IFNγ)] [8-12], des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, du monoxyde d'azote (NO), des prostaglandines [12], des protéases et certains de leurs inhibiteurs naturels. Or, ces molécules, trouvées en concentrations élevées dans le cerveau des patients présentant une MA [7, 13, 14], pourraient être douées de propriétés neurotoxiques [15].

Les protéines du complément

La fraction C1q du complément est présente dans les plaques séniles matures de la MA et à la surface des neurones contenant ou non des DNF. Le système du complément semble pouvoir être activé directement (sans liaison à un anticorps) par Aß et ses fragments activés interagissent avec les récepteurs présents à la surface des cellules microgliales pour induire la formation d'anion superoxide toxique pour le neurone [16]. Ce mécanisme est corroboré par l'observation dans les neurites entourant les plaques séniles et les DNF, du complexe d'attaque de la membrane qui pourrait être à l'origine d'un afflux calcique intracellulaire et d'une opsonisation des protéines complémentaires, conduisant à la dégradation progressive de ces neurites. Les protéines qui régulent l'activité du complément telles que le C1 inhibiteur, la vitronectine, la clustérine et la protectine sont également présentes en grande quantité dans le cerveau des malades et l'équilibre qu'elles assurent vis-à-vis du complément joue probablement un rôle important dans la physiopathologie de la maladie [17].

Les cytokines et les protéines de la phase aiguë de l'inflammation

Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα, l'IL-1α et l'IL-6 sont présentes dans l'environnement des plaques séniles et leur concentration est élevée dans le cerveau et le liquide céphalorachidien des patients atteints de MA [18]. L'IL-6, synthétisée par les astrocytes activés, semble stimuler la synthèse du précurseur amyloïde APP [19] tandis que le Transforming Growth Factor β (TGFβ) favoriserait plutôt son dépôt sous forme de protéine Aß [20]. Le TNFα serait responsable d'une démyélinisation [21]. L'IL-1β serait capable de favoriser la transformation des plaques diffuses en plaques matures [22], ce qui suggère qu'un antagoniste de l'IL-1β (Il-1ra) pourrait avoir un intérêt thérapeutique dans la MA [23, 24]. L'IL-6 est également un inducteur puissant de la synthèse de protéines de la phase aiguë

de l'inflammation telles que l'α 1-antichymotrypsine, le composant P et la Protéine C Réactive, qui sont trouvées en grande quantité dans le cerveau des malades [13]. L'α 1-antichymotrypsine et l'α-2 macroglobuline pourraient favoriser la dégradation de l'APP en Aß, mais aussi, en raison de leurs propriétés inhibitrices de protéases, inhiber la dégradation de la substance amyloïde [25-27].

La présence de cellules T dans le tissu cérébral des malades suggère la participation de l'immunité à médiation cellulaire dans la génèse de la MA [28]. Cette hypothèse est confortée par l'augmentation de la réponse cytotoxique des cellules Naturel Killer des patients vis-à-vis de l'IL-2 et des IFN β et γ [29].

Le stress oxydatif

L'apoptose neuronale induite par Aβ implique la liaison de Aβ à la membrane neuronale par l'intermédiaire de récepteurs, dont celui pour les produits terminaux de glycation (RAGE) [30]. Ces récepteurs RAGE sont largement exprimés à la surface des neurones de l'hippocampe et du cervelet. Ils pourraient permettre la liaison de Aβ aux cellules gliales, ce qui aurait pour conséquence de provoquer leur migration par chimiotactisme et leur activation, pour conduire à la production d'espèces radicalaires neurotoxiques et de cytokines [31]. Le rôle important de la microglie et du stress oxydatif dans la toxicité neuronale de Aβ est confirmé par la réduction de la toxicité de Aβ en présence d'anti-oxydants tels que la vitamine E [32].

Rôle des prostaglandines

Plusieurs études épidémiologiques ont suggéré une possible protection par les AINS vis-à-vis de la MA [33, 34]. En effet, la consommation chronique d'AINS est associée à une diminution du risque de développer la maladie dans la population générale [35-37]. Cet effet protecteur apparent est corrélé à la durée de prescription des AINS [36]. Ces derniers freineraient la détérioration cognitive chez les sujets atteints de MA [38] et retarderaient l'âge de début de la maladie dans les familles à risque. Ces études sont à rapprocher d'un possible effet protecteur vis-à-vis de la MA de la dapsone, antibiotique utilisé dans la lèpre et doué d'une activité anti-inflammatoire, anti-LTB_4 (leucotriène B4) et antiradicalaire [39]. Ainsi, à 2 ans, le risque relatif de développer une MA en cas de consommation quotidienne d'AINS est estimé à 0,4 [36]. L'ibuprofène et d'autres AINS (inhibiteurs de la COX-1 et de COX-2 à différents degrés) sont plus efficaces que l'aspirine à posologie anti-agrégante plaquettaire (inhibition très sélective de COX-1 à faible posologie), suggérant que l'action thérapeutique des AINS est davantage liée à leur activité inhibitrice sur COX-2 que sur COX-1 [37].

Si une expression basale de COX-2 est observée dans les neurones et les astrocytes, COX-2 n'est exprimée dans la glie ou la microglie qu'en cas d'activation par l'IL-1, le TNFα, le lipopolysaccharide (LPS), le β Fibroblast Growth Factor (FGF), ou le NO [40-42]. COX-2, contrairement à COX-1 est surexprimée dans les régions cérébrales affectées par la MA et cette expression de COX-2 rend les neurones plus sensibles à la tocicité de Aβ [43, 44]. Ces résultats suggèrent que la production de prostaglandines (PG) par les cellules inflammatoires (astrocytes et microglie) via COX-2 pourrait participer à la physiopathologie de la MA.

HYPOTHÈSES PHYSIOPATHOLOGIQUES ACTUELLES (*fig. 1*)

Antiinflammatoires non stéroïdiens, prostaglandines et glutamate

L'altération d'un neurone induit la libération présynaptique de glutamate, l'activation des récepteurs NMDA [45, 46] puis l'activation des phospholipases A2 qui libèrent l'acide arachidonique [47]. L'acide arachidonique ainsi produit sert de substrat à COX-2 qui le transforme en PGG_2 et PGH_2, qui sont des précurseurs des PG. Ces PG (la PGE_2 et la prostacycline en particulier) pourraient stimuler les astrocytes et la microglie [48] qui produisent alors des médiateurs potentiellement neurotoxiques (cf *supra*) mais également inhiber la recapture du glutamate, ce qui pourrait conduire à la dégradation neuronale *via* les récepteurs NMDA.

Ce mécanisme explique qu'un inhibiteur de PAF (BN 50739) puisse exercer ●●●

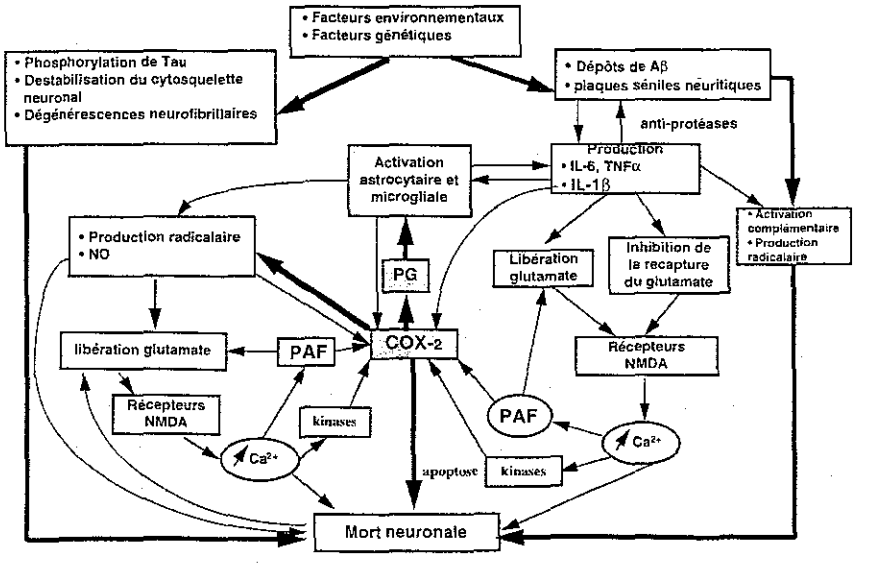


Figure 1. Implication possible de la cyclooxygénase 2 (COX-2) dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate ; TNFα : Tumor Necrosis Factor α ; IL : interleukine ; NO : Monoxyde d'azote ; IFNγ : interféron γ ; ↗ Ca2+ : entrée cellulaire de calcium ; PG : prostaglandine ; Aß : protéine amyloïde.

un effet neuroprotecteur et que le prétraitement par un antagoniste du récepteur du PAF puisse inhiber l'induction, par une crise comitiale ou l'injection d'acide kaïnique, de COX-2 dans l'hippocampe [49, 50]. Cette régulation explique également que les inhibiteurs de phospholipases A2 inhibent la production des eicosanoïdes lors de la croissance neuritique induite par Nervous Growth Factor (NGF) [51] et que l'indométacine, inhibiteur de COX, inhibe l'induction de c-fos par les neurones hypocampiques en culture stimulés par le NMDA [52]. Ceci explique enfin l'expression cérébrale accrue des phospholipases A2 dans la MA.

Cette hypothèse a conduit le groupe menant l'« Alzheimer's Disease Cooperative Study » à étudier l'intérêt des corticoïdes, qui sont des bloqueurs des PLA2 mais également des inhibiteurs de COX-2 (cf *infra*) dans la MA. Les résultats de cette étude devraient être disponibles d'ici peu [53].

Cette hypothèse a conduit à proposer que les AINS pourraient exercer leur action protectrice potentielle vis-à-vis de la MA, d'une part en réduisant la production de PG et d'autre part, en favorisant la recapture du glutamate, inhibant de ce fait la neurotoxicité médiée par l'activation des récepteurs NMDA. Ce dernier mécanisme permettrait de rapprocher les AINS des molécules qui en modulant l'effet des récepteurs NMDA seraient capables d'améliorer les capacités mnésiques des patients présentant une MA [54].

Antiinflammatoires non stéroïdiens et espèces radicalaires

De nombreux travaux suggèrent un rôle physiopathologique des espèces radicalaires dans la dégénérescence neuronale de la MA. Les radicaux libres sont synthétisés principalement *via* le métabolisme mitochondrial mais également lors de la biotransformation de l'acide arachidonique en PG par les COXs, la réaction d'oxydation étant inhibée par les AINS. COX-2 pourrait ainsi favoriser la mort neuronale en induisant la production radicalaire [43]. Cette hypothèse rendrait compte de la réduction de la production des espèces radicalaires et de l'effet protecteur sur les neurones hippocampiques d'un prétraitement par l'indométacine dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire [55]. Cette hypothèse rejoint celle exposée précédemment, puisque COX-2 favorise la production de radicaux libres qui contribuent eux-mêmes à la libération présynaptique de glutamate.

Antiinflammatoires non stéroïdiens et cytokines

La production d'IL-1 β est accrue dans le cerveau des malades souffrant de MA [56]. IL-1β semble capable d'atténuer l'activité métabolique des neurones hippocampiques [57] mais aussi d'activer les astrocytes, comme l'indique la surexpression à leur surface d'une cytokine neurotrophique dénommée S100 β, qui pourrait favoriser la croissance de neurites dystrophiques [58]. Or, COX-2, qui est exprimée constitutivement dans le neurone [59], est aussi exprimée de façon dose-dépendante dans les astrocytes stimulés par l'IL-1β. En plus d'inhiber l'activité astrocytaire de COX-2, les AINS pourraient avoir un rôle inhibiteur direct sur certains effets de l'IL-1 β. Ce mécanisme a été suggéré pour expliquer la capacité de l'indométacine d'inhiber la transformation d'APP en peptides amyloïdes sous l'effet de IL-1β [60].

Les plaques séniles des sujets sains ne contiennent pas d'IL-6, alors qu'elle est exprimée dans les plaques avant l'apparition de la pathologie neuritique [61] ainsi que dans les plaques matures de la MA. Plusieurs études réalisées chez des souris transgéniques surexprimant l'IL-6, sous le contrôle d'un promoteur spécifiquement cérébral, suggèrent son rôle dans la gliose et la neurodégénérescence [62, 63]. Or, la production exagérée d'IL-6 pourrait être médiée par les PG, puisque la PGE2 synthétisée par les cellules microgliales [64] est capable de stimuler la production d'IL-6 par des cellules d'astrocytome humains ou des neurones corticaux [65]. Cet effet stimulant de PGE2 est également observé pour la production d'IL-6 induite par IL-1β [65]. Les inhibiteurs de COX et en particulier de COX-2 pourraient ainsi réduire la synthèse d'IL-6 par la microglie et les astrocytes. Cette hypothèse est renforcée par l'observation, en présence d'un inhibiteur mixte de lipoxygénase et de cyclooxygénase (tenidap), d'une inhibition de la synthèse d'IL-6 induite par IL-1β dans des cellules d'astrocytome [62].

Antiinflammatoires non stéroïdiens et apoptose

Une crise épileptique, provoquée par une injection d'acide kaïnique chez le rat, entraîne l'expression de COX-2 et l'apparition conjointe de caractéristiques morphologiques d'apoptose cellulaire dans l'amygdale et l'hippocampe. Cette observation a fait poser l'hypothèse que l'expression de COX-2 pourrait être associée à l'apoptose neuronale et que les AINS sélectifs de COX-2 pourraient s'opposer à la mort neuronale programmée [66]. Cet effet pro-apoptotique potentiel de COX-2 contraste avec son activité anti-apoptotique dans la muqueuse colorectale. En effet, la transfection transitoire de COX-2 dans les cellules épithéliales digestives s'accompagne d'une résistance à l'apoptose et COX-2 est surexprimée dans les polypes de patients porteurs de polypose familiale, ainsi que dans les tissus cancéreux colorectaux. L'inhibition sélective de COX-2 offrirait cependant des potentialités thérapeutiques dans ces 2 circonstances, en rétablissant un certain niveau d'apoptose en présence d'une prolifération cellulaire exagérée (polypose familiale) et en diminuant l'apoptose en présence d'une dégénérescence cellulaire accrue (maladie d'Alzheimer) [67].

QUESTIONS EN SUSPENS ET ÉLÉMENTS DE RÉPONSE

L'utilisation au long cours d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 n'est-elle pas dangereuse ?

Si les PG produites par les COX-2 dans les astrocytes et la microglie activée semblent jouer un rôle dans l'inflammation cérébrale observée dans la MA, COX-2 semble jouer un rôle tout aussi important dans la physiologie cérébrale, comme l'indiquent son expression basale et la production de PG en dehors de toute stimulation dans les astrocytes [68], les neurones (en particulier corticaux et hippocampiques) [40, 41, 69, 70], les cellules non parenchymateuses des vaisseaux sanguins et les leptoméninges [71]. L'action locale des eicosanoïdes est rendue probable par la présence dans le cerveau de récepteurs des PG et du thromboxane [72].

Les PG issues de COX-2 pourraient intervenir dans la nociception, le cycle veille-sommeil, et dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire [73]. En outre, les PG participent à la régulation de la libération synaptique des neurotransmetteurs, à la neuroprotection et la plasticité neuronale. En effet, la PGE2 (PG la plus représentée dans le cerveau) et la prostacycline produites dans le cerveau en cas d'agression semblent capables de protéger le neurone contre l'hypoxie, le glutamate et les molécules toxiques produites par la microglie [74-77]. De même, l'expression de COX-2 augmente dans les neurones corticaux en cas d'activité synaptique, de crise comitiale [49], en cas d'ischémie-reperfusion [46, 78] et en cas d'inflammation périphérique (injection intraveineuse ou intrapéritonéale de lipopolysaccaride) [79].

Outre son rôle dans la physiologie cérébrale du sujet adulte, COX-2 semble être un acteur essentiel du développement cortical [66, 80], ce qui pose le problème de l'utilisation d'inhibiteurs de COX-2 chez l'enfant ou la femme enceinte. En effet, contrairement à COX-1 dont l'expression est faible chez l'animal nouveau-né et augmente pour atteindre un pic chez l'adulte, COX-2 est exprimé en grande quantité dans le cerveau des animaux nouveau-nés (en particulier dans le néocortex, les structures limbiques et les microvaisseaux) pour diminuer au stade adulte [80, 81]. Le rôle de COX-2 semble d'ailleurs différent chez l'animal en développement ou adulte. Ainsi, COX-2 est exprimée dans le corps cellulaire et dans les dendrites les plus proximales du neurone chez l'animal jeune alors qu'elle est exprimée dans les dendrites distales et la moelle (sites post-synaptiques) chez l'animal adulte. L'expression néonatale élevée de COX-2 explique la présence de niveaux élevés de PG dans le sang et le cerveau à cette période. La contribution des COXs dans le développement neuronal est confortée par l'observation de troubles mnésiques chez le poussin traité par AINS [82].

Pourtant, si les craintes d'effets indésirables neurologiques semblent légitimes au vu des résultats de ces études, aucun effet indésirable majeur n'a été observé avec les AINS classiques (inhibant COX-1 et COX-2) chez l'enfant et aucun événement indésirable neurologique majeur n'a jusqu'à présent été rapporté sous inhibiteur sélectif de COX-2. Comme cela a été décrit récemment par Kirtikara *et al.* chez les souris déficientes en COX-2, COX-1 pourrait être surexprimée en cas d'inhibition prolongée de COX-2 et compenser la production défaillante de PG physiologiques [83].

COX-2, neuroprotectrice ou neurotoxique ?

Alors que toutes les études suggéraient un rôle pathologique de la production astrogliale de PG pro-inflammatoires, 2 équipes ont surpris la communauté scientifique en démontrant une réduction de la production cérébrale des PG et du thromboxane dans la MA et une diminution de l'expression neuronale de COX-2 dans les régions atteintes par le processus neuro-dégénératif (néo-cortex mais pas putamen), en particulier dans les grands neurones hippocampiques particulièrement atteints dans la MA [59, 84]. La diminution de l'expression neuronale de COX-2 pourrait être autant la conséquence de la dégénérescence neuronale (les neurones en moindre nombre expriment moins COX-2) que sa cause (la diminution d'activité neuronale de COX-2 pourrait induire une moindre activité cellulaire, comme l'indique la perte des marqueurs synaptiques dans certaines régions cérébrales [85] et conduire, à terme, à l'apoptose neuronale).

De ces observations est née l'hypothèse d'une ambivalence fonctionnelle de COX-2, jouant un rôle physiologique et neuroprotecteur quand elle est produite à l'état basal par les neurones et les astrocytes et neurotoxique quand elle est produite par les cellules astrogliales activées comme c'est le cas dans la MA. Cette ambivalence fonctionnelle pourrait être expliquée en partie par la nature des PG produites *via* COX-2 par les cellules astro-gliales activées au cours de la MA. En effet, PGD_2, PGE_2, et $PGF_{2\alpha}$ semblent avoir une action modulatrice sur la neurotransmission alors que la prostacycline semble faciliter la neurotransmission excitatrice dans l'hippocampe. Une autre explication est l'expression de récepteurs différents sur les cellules neuronales et astrocytaires par rapport aux cellules neuronales en voie de dégénérescence et aux cellules astro-gliales activées. En effet, une même PG (par exemple PGE_2) est capable d'induire une entrée de calcium cellulaire via le récepteur EP1, une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc *via* EP2 ou une diminution du taux d'AMPc *via* EP3. Enfin, la présence en grande quantité de substances susceptibles de moduler l'activité de COX-2 dans la MA pourrait constituer une autre explication au rôle tantôt neuro-protecteur tantôt neurotoxique de COX-2. Ainsi, la production microgliale de NO et d'IFNγ [16, 86] serait capable de moduler l'expression de COX-2 par la microglie et les neurones [12]. Si la NO synthase est présente en grande quantité dans le cortex, l'hippocampe et l'amygadale [40], le rôle du NO n'est pas clairement défini. Certains auteurs suggèrent que le NO et l'IFNγ inhibent la production de PG par COX-2 et pourraient faciliter la neurotransmission neurotoxique, entraîner la mort neuronale [87], induire une démyélinisation [88], limiter la réaction immunitaire [89] et perturber la régulation de fonctions gliales contrôlées par l'AMPc [90]. D'autres auteurs ont proposé que des concentrations faibles de NO pourraient activer les COXs alors que des concentrations élevées les inhiberaient. Si l'interaction entre le NO et COX-2 est complexe et demeure mal connue, la balance entre la production de PG et celle de NO semble aussi importante dans l'induction que dans la limitation de la réaction inflammatoire, de la réponse immunitaire et de la neurodégénérescence [91].

Les inhibiteurs de COX-2 interviennent-ils sur le mécanisme causal de la neurodégénérescence ?

Si les AINS semblent réduire le risque de développer une MA, probablement en jouant un rôle sur la composante inflammatoire de la maladie, l'étude de Mackenzie suggère qu'ils n'ont pas d'efficacité sur le mécanisme causal de la neurodégénérescence [92, 93]. En effet, les AINS réduisent l'activation microgliale, sans pour autant réduire la formation des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires qui sont étroitement liées à l'apparition des troubles cognitifs. ●●●

CONCLUSION

De nombreuses études confirment le rôle important joué par l'inflammation (par l'intermédiaire des astrocytes et de la microglie activés) dans la physiopathologie de la MA. Aucune donnée ne permet pourtant d'établir avec certitude si l'inflammation est la cause ou la conséquence de la neurodégénérescence. Les AINS prescrits au long cours semblent réduire le risque de développer une MA, en particulier en réduisant la production de PG neurotoxiques, suggérant que la composante inflammatoire de la maladie semble devoir être combattue. Les AINS inhibant sélectivement COX-2 représentent une sous-classe médicamenteuse théoriquement intéressante pour réduire cette composante inflammatoire, tant en raison du rôle spécifique probable de COX-2 dans la MA qu'en raison de leur meilleure tolérance digestive que les AINS classiques en cas de precription au long cours. Des études multi-centriques en double insu contre placebo concernent le rofécoxib, avec 2 études de phase II pour estimer si la molécule est capable de prévenir ou retarder l'apparition des symptômes de la MA chez des sujets ayant des troubles cognitifs modérés ou de retarder l'évolution de la MA quand elle est diagnostiquée et le célécoxib avec une étude débutée depuis 2 ans évaluant l'intérêt de la molécule quand le diagnostic de MA est posé ; elles devraient permettre rapidement de répondre aux interrogations suscitées par cette nouvelle et prometteuse génération d'AINS. ❑

Remerciements : *Les auteurs tiennent à remercier Evelyne Colopi pour son aide précieuse dans la mise en forme de ce travail.*

[Références]

1. Bazan NG, Marcheselli VL, Mukherjee PK. Inducible prostaglandin synthase in cell injury. Advances in prostaglandin, thromboxane and leukotriene research, vol 23. edited by B Samuelsson *et al.* Raven Press, ltd; New York 1995.
2. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemoprotective activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998 ; **58**:409.
3. Hawkey CJ. COX-2 inhibitors. *Lancet* 1999 ; **353**:307-14.
4. Lue LF, Brachova L, Civin WH, Rogers J. Inflammation, Ab deposition and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996 ; **55**:1083-8.
5. Sheng JG, Mrak RE, Griffin WST. Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompagnied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic form. *Acta Neuropathol* 1997 ; **94**:1-5.
6. Sasaki A, Yamaguchi H, Ogawa A *et al.* Microglial activation in early stages of amyloid beta protein deposition. *Acta Neuropathol* 1997 ; **94**:316-22.
7. McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG. Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. *Neurosci Lett* 1989 ; **107**:341-6.
8. Pasinetti GM. Inflammatory mechanisms in neurodegeneration and Alzheimer's disease : the role of the complement system. *Neurobiol Aging* 1996 ; **17**:707-16.
9. Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein G. The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 1996 ; **20**:445-52.
10. Frei K, Malipierp U, Leist T, Sinkernagel R, Schwab M, Fontana A. One the cellular source and function of interleukin-6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol* 1989 ; **19**:689-94.
11. Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 1989 ; **491**:394-7.
12. Minghetti L, Polazzi E, Nicolini A, Creminon C, Levi G. Interferon-g and nitric oxide down-regulate lipopolysaccharide-induced prostanoids production in cultured rat microglial cells by inhibiting cyclooxygenase-2 expression. *J Neurochem* 1996 ; **66**:1963-70.
13. Matsubara E, Hirai S, Amari M *et al.* Alpha 1-antichymothrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol* 1990 ; **28**:561-7.
14. Bauer J, Ganter U, Strauss S *et al.* The participation of interleukin-6 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Res Immunol* 1992 ; **143**:650-7.
15. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993 ; **7**:111-8.
16. Eikelboom P, Veerhuis R. The role of complement and activated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996 ; **17**:673-80.
17. McGeer PL, McGeer EG. Complement proteins and complement inhibitors in Alzheimer's disease. *Res Immunol* 1992 ; **143**:621-4.
18. Griffin WST, Stanley LC, Ling C *et al.* Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; **86**:7611-5.
19. Goldgaber D, Harris HW, HLA T *et al.* Interleukin-1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; **86**:7606-10.
20. Wyss-Coray T, Masliah E, Mallory M *et al.* Amyloidogenic role of cytokines TGF-beta 1 in trans genic mice and in Alzheimer's disease. *Nature* 1997 ; **389**:603-6.
21. Brosnan CF, Selmaj K, Ranie CS. Hypothesis : a role for tumor necrosis factor in immune mediated demyelinisation and its relevance to multiple sclerosis. *J Immunol* 1988 ; **18**:87-94.
22. Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS. Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum Pathol* 1995 ; **26**:816.
23. Rothwell NJ, Relton JK. Involvment of interleukin-1 and lipocortin-1 in ischemic brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1993 ; **5**:178-98.
24. Keane KM, Giegel DA, Lipinski WJ *et al.* Cloning, tissue expression and regulation of rat interleukin 1 beta converting enzyme. *Cytokine* 1995 ; **7**:105.
25. Hampel H, Müller N. Inflammatory and immunological mechanisms in Alzheimer's disease. *Drug N Perspect* 1995 ; **8**:599-608.
26. Cochran FR, Vitek MP. Neuroinflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: new opportunities for drug discovery. *Expert Opin Invest Drugs* 1996 ; **5**:449-55.
27. Vandenabeele P, Fiers W. Is amyloidogenesis during Alzheimer's disease due to an Il-1/Il-6 mediated « acute phase response » in the brain. *Immunol Today* 1991 ; **12**:217-9.
28. Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H. Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's brain tissue. *Neurosci Lett* 1988 ; **91**:259-64.
29. Solerte SB, Fioravanti M, Servergnini S *et al.* Excitatory pattern of gamma-interferon on natural killer cell activity in senile dementia of the Alzheimer type. *Dementia Geriatr Cogn Disord* 1997 ; **8**:308-13.
30. Yan SD, Chen X, Fu J et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996 ; **382**:685-91.
31. Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE *et al.* Excess brain protein oxidation and enzyme dysfonction in normal aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; **88**:10540-3.
32. Loo DT, Copani A, Pike CJ *et al.* Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; **90**:7951-5.
33. McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease : a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 1996 ; **47**:425-32.
34. Nourhashémi F, Ousset PJ, Reyes G *et al.* Anti-inflammatoires non stéroïdiens et maladie d'Alzheimer. *Presse Med* 1998 ; **27**:25-8.
35. Doraiswamy P, Krishen A, Stallone F, Martin W, Potts N, Metz A, De Veaugh-Geiss J. NSAIDs and cognition in Alzheimer's disease. *Neurology* 1996 ; **47**:1194.
36. Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ. Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 1997 ; **48**:626-32.
37. Andersen K, Launer LJ, Ott A *et al.* Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? The Rotterdam study. *Neurology* 1997 ; **48**:626-32.
38. Rich JB, Rasmusson DX, Folstein MF *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Neurology* 1995 ; **45**:51-5.
39. Schnabel J. New Alzheimer's therapy suggested (research news). *Science* 1993 ; **260**:1719-20.
40. Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons : regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993 ; **11**:371-86.

41. Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P. 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**:2317-21.

42. Minghetti L, Levi G. Induction of prostanoid biosynthesis by bacterial lipopolysaccharide and isoproterenol in rat microglial cultures. *J Neurochem* 1995 ; **65**:2690-8.

43. Ho L, Pieroni C, Winger D, Purohit DP, Aisen PS, Pasinetti GM. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 1999 ; **57**:295-303.

44. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res* 1999 ; **830**:226-36.

45. Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci* 1997 ; **17**:2746-55.

46. Miettinen S, Fusco FR, Yrjanheikki J *et al.* Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; **94**:6500-5.

47. Clements MP, Bliss TV, Lynch MA. Increase in arachidonic acid concentration in a postsynaptic membrane fraction following the induction of long-term potentiation in the dentate gyrus. *Neuroscience* 1991 ; **45**:379-89.

48. Weisman G. Prostaglandins as modulators rather than mediators of inflammation. *J Lipid Mediat* 1993 ; **6**:275-86

49. Marcheselli VL, Bazan NG. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus. Inhibition by a platelet-activating factor antagonist. *J Biol Chem* 1996 ; **271**:24794-9.

50. Chen J, Marsh T, Zhang JS, Graham SH. Expression of cyclooxygenase 2 in rat brain following kainate treatment. *Neuro Report* 1995 ; **6**:245-8.

51. De George JJ, Walenga R, Carbonetto S. Nerve growth factor rapidly stimulates arachidonate metabolism in PC12 cells : potential involvment in nerve fiber growth. *J Neurosci Res* 1988 ; **21**:323-32.

52. Lerea LS, McNamara JO. Ionotropic glutamate receptor subtypes activate c-fos transcription by distinct calcium-requiring intracellular signalling pathways. *Neuron* 1993 ; **10**:31-41.

53. Aisen PS, Panisetti GM. Glucocorticoids in Alzheimer's disease. The story so far. *Drugs Aging* 1998 ; **12**:1-6.

54. Schwartz BL, Hastroudi S, Herting RL, Schwartz BA, Deutsch SI. d-Cycloserine enhances implicit memory in Alzheimer patients. *Neurology* 1996 ; **46**:420-4.

55. Deluga KS, Plotz FB, Betz AL. Effect of indomethacin on edema following single and repetitive cerebral ischemia in the gerbil. *Stroke* 1991 ; **22**:1259-64.

56. Liu T, McDonnell PC, Young PR *et al.* Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke* 1993 ; **24**:1746-50.

57. Plata-Salaman CR, Ffrench-Mullen JMH. interleukin-1β depresses calcium currents in CA1 hippocampal neurons at pathophysiological concentrations. *Brain Res Bull* 1992 ; **29**:221.

58. Sheng JG, Ito K, Skinner DS *et al. In vivo* and *in vitro* evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* 1996 ; **17**:761-6.

59. Chang JW, Coleman PD, O'Banion K. Prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) mRNA expression is decreased in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996 ; **17**:801-8.

60. Dash PK, Moore AN. Enhanced processing of APP induced by Il-1b can be reduced by indometacin and nordihydroguaiaretic acid. *Biochem Biophys Res Comm* 1995 ; **208**:542-8.

61. Huell M, Strauss S, Volk B, Berger M, Bauer J. Interleukin-6 is present in early stages of plaque formation and is restricted to brains of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol* 1995 ; **89**:544-51.

62. Hüll M, Fiebich L, Lieb K, Strauss S, Berger M, Volk B, Bauer J. Interleukin-6-associated inflammatory processes in Alzheimer's disease : new therapeutic options. *Neurobiol Aging* 1996 ; **17**:795-800.

63. Chiang CS, Stalder A, Samimi A, Campbell IL. Reactive gliosis as a consequence of interleukin-6 expression in the brain : studies in transgenic mice. *Dev Neurosci* 1994 ; **16**:212-21.

64. Slepko N, Levi G. Progressive activation of adult microglial cells *in vitro*. *Glia* 1996 ; **16**:241-6.

65. Fujimoto N, Kaneto T, Eguchi N, Urade Y, Mizuno N, Hayaishi O. Biochemical and immunohistochemical demonstration of a tightly bound form of prostaglandin E2 in the rat brain. *Neuroscience* 1992 ; **49**:591-606.

66. Tocco G, Freire-Moar 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**:339-49.

67. Shiff SJ, Rigas B. Nosteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer. Evolving concepts of their chemopreventive actions. Viewpoints in digestive diseases. *Gastroenterology* 1997 ; **113**:1992-8.

68. Seregi A, Keller M, Hertting G. Are cerebral prostanoids of astroglial origin? Studies on the prostanoid forming system in developing rat brain and primary cultures of rat astrocytes. *Brain Res* 1987 ; **404**:113-20.

69. Lerea LS, Carlson NG, Simonato M, Morrow J, Roberts JL, Mc Namara JO. Prostaglandin F 2 alpha is required for NMDA receptor-mediated induction of c-fos m RNA in dentate gyrus neurons. *J Neurosci* 1997 ; **17**:117-24.

70. Breder CD,Dewitt DL, Kraig RP. Characterization of inducible cyclooxygenase in the rat brain. *J Comp Neurol* 1995 ; **355**:296-315.

71. Cao C, Matsumara K, Yamagata K, Watanabe Y. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. *Brain Res* 1995 ; **697**:187-96.

72. Matsumara K, Watanabe Y, Onoe H, Watanabe Y. Prostacyclin receptor in the brain and central terminals of the primary sensory neurons : an autoradiographic study using a stable prostacyclin analogue (3H)iloprost. *Neuroscience* 1995 ; **65**:493-503.

73. Rivest S, Rivier C. Centrally injected interleukin-1 beta inhibits the hypothalamic LHRH secretion and circulating LH levels via prostaglandins in rat. *J Neuroendocrinol* 1993 ; **5**:445-50.

74. Cazevielle C, Muller A, Meynier G, Dutrait N, Bonne C. Protection by prostaglandins from glutamate toxicity in cortical neurons. *Neurochem Int* 1994 ; **24**:395-8.

75. Akaike A, Kaneko S, Tamura Y, Nakata N, Shiomi H, Ushikubi F, Narumiya S. Prostaglandin E2 protects cultured cortical neurons against N-methyl-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res* 1994 ; **663**:237-43.

76. Cazevieille C, Muller A, Bonne C. Prostacyclin (PGI2) protects rat cortical neurons in culture against hypoxia/reoxygenation and glutamate-induced injury. *Neurosci Lett* 1993 ; **160**:106-8.

77. Théry C, Dobbertin A, Mallat M. Downregulation of in vitro neurotoxicity of brain macrophages by prostaglandin E2 and b-adrenergic aganist. *Glia* 1994 ; **11**:383-6.

78. Adams J, Collaco-Moraes Y, De Belleroche J. Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex : an intracellular response to synaptic excitation. *J Neurochem* 1996 ; **66**:6-13.

79. Breder CD, Saper CB. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopoplysaccharide. *Brain Research* 1996 ; **713**:64-9.

80. Kaufmann WE, Worley PF, Taylor CV, Bremer M, Isakson PC. Cyclooxygenase-2 expression during rat neocortical development and in Rett syndrome. *Brain Dev* 1997 ; **19**:25-34.

81. Peri KG, Hardy P, Li DY, Varma DR, Chemtob S. Prostaglandin G/H synthase-2 is amajor contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem* 1995 ; **270**:24615-20.

82. Hölscher C. Inhibitors of cyclooxygenases produce amnesia for a passive avoidance task in the chick. *Eur J Neurosci* 1995 ; **7**:1360-5.

83. Kirtikara K, Morham SG, Raghow R *et al.* Compensatory Prostaglandin E2 Biosynthesis in Cyclooxygenase 1 or 2 Null Cells. *J Exp Med* 1998 ; **187**:517-23.

84. West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JD. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 1994 ; **344**:769-72.

85. Terry RD, Masliah E, Salmon DP *et al.* Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease : synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991 ; **30**:572-80.

86. Luth HJ, Arendt T. Oxyde nitrique et maladie d'Alzheimer. Mise au point. Alzheimer Acualités. 1998 ; **132**:6-11.

87. Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchanese RB, Friedlander MJ. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 1994 ; **263**:973-7.

88. Mitrovic B, Ignarro LJ, Vinters HV *et al.* Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes. *Neuroscience* 1995 ; **65**:531-9.

89. Heuschling P. Nitric oxide modulates g-interferon-induced MHC class II antigen expression on rat astrocytes. *J Neuroimmunol* 1995 ; **57**:63-9.

90. Sawada M, Suzumura A, Ohno K, Marunouchi T. Regulation of astrocyte proliferation by PGE2 and the a subtype of protein kinase C. *Brain Res* 1993 ; **613**:67-73.

91. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I *et al.* Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; **91**:2046-50.

92. Mackenzie IRA, Hao C, Munoz DG. The role of microglia in senile plaque formation. *Neurobiol Aging* 1995 ; **16**:797-804.

93. Mackenzie IRA, Munoz DG. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology* 1998 ; **50**:986-90.

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

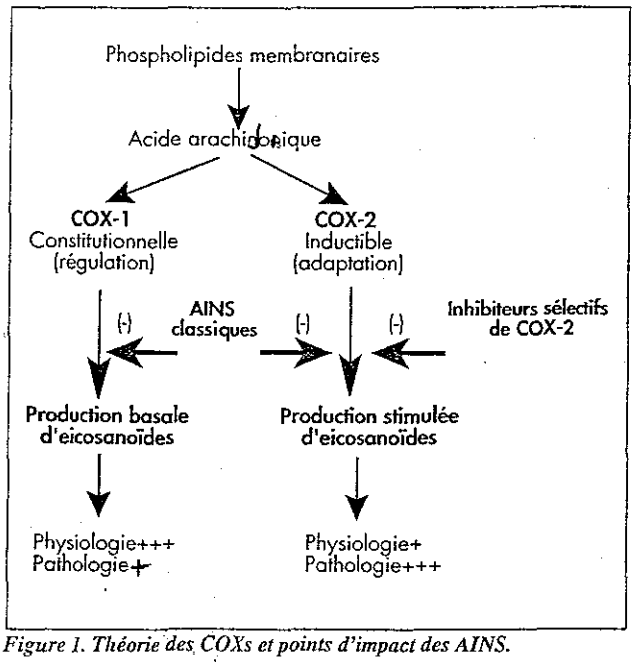


Figure 1. Théorie des COXs et points d'impact des AINS.

certains de leurs effets indésirables (digestifs notamment) paraissent imputables à l'inhibition de COX-1.

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 $C_{I50COX\text{-}1}/C_{I50COX\text{-}2}$ ou un rapport faible si indice $C_{I50COX\text{-}2}/C_{I50COX\text{-}1}$). 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

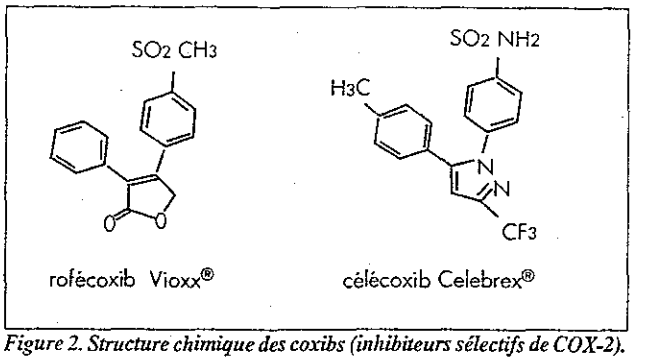


Figure 2. Structure chimique des coxibs (inhibiteurs sélectifs de COX-2).

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.*

III. ETUDE EXPERIMENTALE

III.1. Contexte général de l'étude

La découverte récente des 2 iso-enzymes COX-1 et COX-2 constitue donc une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes d'action des AINS (inhibition de COX-1 responsable de leur effet anti-agrégant plaquettaire et de leurs effets indésirables digestifs et inhibition de COX-2 responsable de la majorité de leurs propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et anti-pyrétiques). Cette notion de sélectivité pour les iso-enzymes de la COX a logiquement conduit à proposer une nouvelle classification des AINS, faisant appel à des critères enzymatiques (étude des pouvoirs inhibiteurs sur enzymes isolées, lignées cellulaires ou sang total), pharmacologiques (étude des pouvoirs inhibiteurs après prise d'AINS dans le sang total ou dans d'autres tissus cibles) et cliniques (étude du pouvoir inhibiteur de l'activité plaquettaire aux posologies utilisées en thérapeutique et fréquence des effets indésirables digestifs). Les études cliniques avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2 montrent une réduction significative des effets indésirables digestifs sévères pour une efficacité thérapeutique équivalente à celle des AINS classiques et confirment l'intérêt de cette nouvelle classification. La description récente de nouvelles indications avérées (polypose intestinale familiale) et potentielles des coxibs, tant dans le domaine oncologique (cancer colo-rectal en particulier) que neurologique (démence sénile de type Alzheimer en particulier) explique l'intérêt croissant pour cette classe thérapeutique. Cependant, parce que COX-2 intervient dans nombreux processus physiologiques tels que l'homéostasie rénale, la vasodilatation et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, ou pathologiques tels que la cicatrisation de l'ulcère gastrique ou la résolution des processus inflammatoires (coliques en particulier), il est possible qu'il faille à l'avenir produire des molécules:

→ inhibant suffisamment COX-2 pour qu'elles possèdent des propriétés inflammatoires significatives, sans supprimer totalement la production dépendante de COX-2 de PGI_2 et de la 15-déoxy PGJ_2 contribuant à la résolution de la phase tardive de l'inflammation, la régulation de l'hémostase, du tonus vasculaire et de l'homéostasie rénale.

→ épargnant suffisamment COX-1 pour ne pas entraîner d'effet indésirable gastrique sévère tout en réduisant la production dépendante de COX-1 de PG potentiellement inflammatoires.

Bien que les effets thérapeutiques ou indésirables des AINS ne soient peut-être pas exclusivement liés à leur pouvoir inhibiteur sur les COXs, ces nouvelles connaissances suggèrent la nécessité de disposer à l'avenir d'outils précis pour évaluer le niveau d'inhibition des 2 COXs par les molécules en développement.

Si la méthode sur sang total représente le « gold standard » actuel pour mesurer le pouvoir inhibiteur des AINS sur les COXs, il reste à déterminer:

→ si la précision de cette méthode est suffisante pour déterminer assez finement le profil d'inhibition des COXs permettant d'apporter des indications utiles sur les effets thérapeutiques ou indésirables cliniques à attendre des molécules développées.

→ si les courbes *in vitro* d'inhibition des COXs en fonction des concentration d'AINS permettent, pour un AINS donné, de prédire à partir de sa concentration sanguine au pic et à l'équilibre, le niveau d'inhibition réellement mesuré *ex vivo* après prise orale de l'AINS. Si cette extrapolation est possible, la seule réalisation des études *in vitro* sur sang total permettrait d'estimer avec précision le niveau d'inhibition des COXs par les AINS en connaissant leur concentration sanguine au pic et à l'état d'équilibre pharmacocinétique, ce qui permettrait de se passer d'études cliniques plus contraignantes.

III.2. Objectifs

L'objectif de l'étude était de comparer chez le volontaire sain, en utilisant le système sang total, le pouvoir inhibiteur de 3 AINS ayant une efficacité clinique similaire et un profil d'inhibition des COXs différent dans plusieurs systèmes *in vitro*: l'ibuprofène (inhibiteur réputé préférentiel de COX-1), le diclofénac (possédant un profil d'inhibition équilibré entre les 2 iso-enzymes) et le méloxicam (inhibiteur réputé préférentiel de COX-2) afin de déterminer:

→ la variabilité des mesures d'inhibition *in vitro* et *ex vivo* (variation intra- et interindividuelle) avec le système sang total

→ si les résultats obtenus par la méthode sang total *in vitro* permettent de prédire de manière acceptable les résultats obtenus par la même méthode *ex vivo*, c'est à dire après prise orale d'AINS, et ceci à des moments ayant une pertinence pharmacocinétique (pic sérique après prise unique ou répétée de médicament)

→ si pour le méloxicam, l'inhibition préférentielle de COX-2 observée *in vitro* dans différents modèles est également observée *ex vivo* en situation thérapeutique (7,5 mg/j)

→ l'importance de la fixation protéique et pour l'ibuprofène, de l'inversion chirale, dans la mesure du pouvoir inhibiteur des AINS sur les COXs

En effet, en raison de la forte fixation protéique des AINS (>90%), et en particulier à l'albumine, il est important de savoir si les résultats *in vitro* et *ex vivo* obtenus sur sang total chez le sujet sain sont extrapolables aux situations inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde) dans lesquelles l'albuminémie est significativement diminuée. Parce que la fraction libre des médicaments augmente significativement en condition inflammatoire, les résultats *in vitro* et *ex vivo* seront analysés en considérant les concentrations libres, seules actives, et les concentrations totales des médicaments.

→ si le profil d'inhibition des COX sanguines a des répercussions sur le pouvoir inhibiteur des AINS sur les prostaglandines urinaires (PGE_2, $PGF_{2\alpha}$)

III.3. Descriptif de l'étude

III.3.1 Caractéristiques de l'étude

Il s'agit d'un essai croisé, à 6 bras, randomisé (attribution aléatoire des traitements par table de permutation) et ouvert (anonymat au niveau des dosages). L'étude a été réalisée dans le Service de Rhumatologie Clinique du CHU de Nancy disposant d'un agrément pour la réalisation d'études de recherches biomédicales sans bénéfice individuel direct. Les dosages de TXB_2, de PGE2 et de médicaments ont été réalisés dans le Département de Pharmacologie Clinique du CHU de Nancy, UMR 7561, Centre National de la Recherche Scientifique-Université Henri Poincaré Nancy I, Vandœuvre-lès-Nancy. Cette étude a été supportée par un financement (971016) de l'AFSSAPS et sa promotion a été assurée par le CHU de Nancy.

III.3.2 Nombre de sujets nécessaires

Le nombre de sujets inclus a été retenu en tenant compte des données de la littérature relatives aux fluctuations des taux sériques de TXB_2 produit au cours de la coagulation [17, 32], des taux plasmatiques de PGE_2 produite après stimulation par une endotoxine bactérienne [17] et de prostaglandines urinaires [32, 231]. Ces résultats suggèrent que, chez le sujet sain, les paramètres sanguins ont un cœfficient de variation de 10 à 30 % et que les paramètres urinaires ont un cœfficient de variation de 20 à 40 %. Si l'on considère comme significative une réduction de la production d'eicosanoïdes d'au moins 50 %, que l'on choisit un risque α de première espèce de 5 % et un risque de seconde espèce β de 5 %, le nombre minimal de sujets nécessaires pour cette étude, calculé selon la formule de POCOCK, est de 21.

III.3.3 Choix des AINS et de leur posologie

Les AINS testés ont été sélectionnés en raison

→ de leur efficacité comparable dans la polyarthrite rhumatoïde et/ou les poussées congestives d'arthrose,

→ de leurs différents profils de sélectivité pour les iso-enzymes de COX dans les systèmes *in vitro*: inhibition préférentielle de COX-1 pour l'ibuprofène, inhibition équilibrée des 2 iso-enzymes pour le diclofénac, inhibition préférentielle de COX-2 pour le méloxicam,

→ de leur appartenance aux 3 principales classes chimiques d'AINS (arylpropioniques, arylcarboxyliques, oxicams)

→ de leur demi-vie différente: demi-vie courte pour l'ibuprofène et le diclofénac ou demi-vie longue pour le méloxicam.

La posologie sélectionnée correspond à la moitié de leur posologie maximale recommandée [42, 43, 50], ce qui correspond en pratique clinique à une posologie anti-inflammatoire d'entretien utilisée dans les études cliniques des AINS dans l'arthrose. Les sujets ont pris successivement dans un ordre aléatoire du diclofénac 75 mg LP (Voltarène), un le matin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), ou du méloxicam 7,5 mg (MOBIC®), 1 le matin (Bœhringer Ingelheim, Biberach, Allemagne) ou de l'ibuprofène 400 mg (BRUFEN®), 1 le matin, 1 à midi et 1 le soir (400 mg) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). L'observance a été contrôlée par un appel téléphonique, le comptage du nombre de comprimés restants et le dosage de l'AINS consommé.

III.3.4. Choix des fenêtres thérapeutiques entre 2 traitements successifs

Les fenêtres thérapeutique ont été adaptées aux caractéristiques pharmacocinétiques des produits: demi-vie de l'ibuprofène de 2 h , du diclofénac de 3 h, soit une fenêtre de 2 jours

après traitement par ibuprofène ou diclofénac ; demi-vie du méloxicam de 20 h, soit une fenêtre d'au moins 5 jours après traitement par méloxicam.

III.3.5. Choix des temps de mesures du pouvoir inhibiteur sur les COXs après prise orale

Les mesures du pouvoir inhibiteur sur les COXs après prise orale des AINS ont été réalisées à des moments déterminés en fonction des données pharmacocinétiques de la littérature:

→ pour les dosage sanguins : - au pic de concentration (2 h 30 après la prise d'ibuprofène, 3 h 30 après la prise de diclofénac, 5 h 30 après prise de méloxicam) et - à l'état d'équilibre pharmacocinétique (après 2 jours de traitement pour l'ibuprofène, 3 jours de traitement pour le diclofénac et 5 jours de traitement pour le méloxicam) et au pic (2 h 30 après la dernière prise d'ibuprofène, 3 h 30 après la dernière prise de diclofénac, 5 h 30 après la dernière prise de méloxicam).

→ pour les dosages urinaires : - Les mesures des eicosanoïdes urinaires ont été réalisées la veille de chaque traitement (soit 3 recueils) et à l'état d'équilibre pharmacocinétique soit après 2 jours de traitement par ibuprofène, 3 jours de traitement par diclofénac et 5 jours de traitement par méloxicam.

Les 6 groupes de 4 sujets sont donc répartis comme suit:

Méloxicam (6j) / *Wash-out (7j)* / Ibuprofène (3j) / *Wash-out (2j)* / Diclofénac (4j): 4 sujets
Méloxicam (6j) / *Wash-out (7j)* / Diclofénac (4j) / *Wash-out (2j)* / Ibuprofène (3j): 4 sujets
Ibuprofène (3j) / *Wash-out (2j)* / Méloxicam (6j) / *Wash-out (7j)* /Diclofénac (4j): 4 sujets
Ibuprofène (3j) / *Wash-out (2j)* / Diclofénac (4j) / *Wash-out (2j)* / Méloxicam (6j): 4 sujets
Diclofénac (4j) / *Wash-out (2j)* / Ibuprofène (3j) / *Wash-out (2j)* / Méloxicam (6j): 4 sujets
Diclofénac (4j) / *Wash-out (2j)* / Méloxicam (6j) / *Wash-out (7j)* / Ibuprofène (3j): 4 sujets

Les durées des différentes séquences correspondent au temps de traitement + 1 jour supplémentaire pour les recueils des urines de référence.

Pour chaque groupe a été éditée une feuille récapitulative des horaires et jours de prises médicamenteuses et de recueils de sang et d'urines dont un exemple est montré ci-dessous

	Méloxicam	
	Prélèvements	***Posologie***
J0	Urines 24 h	-
J1	Sang: 7 h - 8 h (T_0) Sang: 13 h - 14 h (T_p)	7,5 mg à 8 h
J2	-	7,5 mg à 8 h
J3	-	7,5 mg à 8 h
J4	-	7,5 mg à 8 h
J5	Sang: 13 h - 14 h (T_f) Urines 24 h	7,5 mg à 8 h
J6 à J12	WASH-OUT	WASH-OUT
	Ibuprofène	
	Prélèvements	***Posologie***
J13	Urines 24 h	-
J14	Sang: 11 h - 12 h (T_0) Sang: 14 h - 15 h (T_p)	400 mg à 12 h 400 mg à 20 h
J15	- - -	400 mg à 8 h 400 mg à 12 h 400 mg à 20 h
J16	Sang: 10 h - 11 h (T_f) Urines 24 h	400 mg à 8 h
J17 à J18	WASH-OUT	WASH-OUT
	Diclofénac LP	
	Prélèvements	***Posologie***
J19	Urines 24 h	-
J20	Sang: 7 h - 8 h (T_0) Sang: 11 h - 12 h (T_p)	75 mg à 8 h
J21	-	75 mg à 8 h
J22	Sang: 11 h - 12 h (T_f) Urines 24 h	75 mg à 8 h

Tableau 4: Exemple de protocole remis aux sujets du groupe 1 dont la séquence de prise des AINS est: méloxicam / ibuprofène / diclofénac T_0: état basal (absence de médicament) ; T_p: après prise unique de médicament (effet inhibiteur au pic plasmatique ; T_f: état final (effet inhibiteur à l'état d'équilibre).

III.4. Sujets et méthodes

III.4.1. Critères démographiques et d'inclusion de la population étudiée

Ont été inclus dans l'étude 24 sujets de sexe masculin, ambulatoires, d'âge moyen 23 ± 2 ans, de taille moyenne 1,80 ± 0,08 m et dont le poids moyen était dans les 20% des valeurs idéales définies par la Metropolitan Life Insurance (poids moyen de 68,8 kg; extrêmes, 52,0 à 96,0 kg). Il s'agissait de sujets en bonne santé d'après l'interrogatoire. N'ont pas été inclus les sujets ayant une pathologie aiguë ou chronique, en particulier hépatique et rénale, une allergie aux AINS et/ou des antécédents d'ulcère, de perforation , de saignement ou de chirurgie à l'estomac ou au duodénum et/ou présentant des douleurs ou une malfonction gastro-intestinales qui pourrait interférer avec l'absorption du médicament (y compris diarrhée). Etaient aussi exclus les sujets présentant des troubles de la coagulation ou recevant des traitements interagissant avec l'hémostase, ayant une consommation tabagique supérieure à 10 cigarettes par jour, ayant participé à tout autre essai clinique ou pharmaceutique dans les trois mois précédant l'étude ou pendant un délai imposé par un essai antérieur supérieur à trois mois, les sujets ayant eu une perte sanguine de 400 ml ou plus dans les trois mois précédant l'étude (don du sang), les sujets ayant atteint le plafond d'indemnités de 25 000 Francs (3810 Euros) au cours des douze derniers mois ou atteignant ce plafond lors du versement de l'indemnité prévue dans cette étude.

Les sujets ont ensuite bénéficié d'un examen médical. Etaient exclus, les sujets dont la pression artérielle systolique n'était pas comprise entre 100 et 140 mm Hg et diastolique entre 50 et 90 mm Hg. Etaient exclus, les sujets dont la fréquence cardiaque n'étaient pas comprise entre 45 et 100 battements par minute, après un repos en décubitus de cinq minutes. Pour pouvoir être inclus dans l'étude, les sujets devaient avoir un électrocardiogramme sans anomalie et des capacités mentales, culturelles et intellectuelles suffisantes pour comprendre les consignes et

souscrire à un tel protocole en toute indépendance. Avant inclusion définitive, les sujets ont bénéficié d'un bilan biologique qui devait être normal, incluant sérologie HIV_1 et HIV_2 négative, antigène Hbs négatif, sérologie HCV négative, NFS, ionogramme sanguin, dosage des transaminases et de la protéine C réactive normaux.

Les sujets ne devaient prendre aucun médicament pendant une période s'étendant de 2 semaines avant le début de l'étude jusqu'à la fin de l'étude, et en particulier pas d'aspirine ou d'AINS. En cas de prise médicamenteuse, ils s'engageaient à en informer l'investigateur principal, qui déciderait alors d'une sortie de l'étude. Par ailleurs, les sujets devaient être affiliés à un régime de Sécurité Sociale. L'étude a été approuvée par le Comité d'Ethique de Nancy et tous les sujets ont signé un consentement éclairé (cf. annexes).

Les caractéristiques d'éligibilité de chaque volontaire pressenti pour entrer dans l'essai, qu'il ait été inclus définitivement ou non ont été conservés par l'investigateur. Pour préserver la confidentialité liée à ces données, les volontaires n'ont été identifiés que par leurs initiales et leur date de naissance. Pendant toute la durée de l'étude, les volontaires ont disposé d'un numéro de téléphone qui leur a permis de joindre à tout moment les investigateurs en cas d'effets indésirables. Pour ne pas déséquilibrer l'analyse statistique de l'étude, toute sortie prématurée aurait été remplacée par une nouvelle inclusion, mais aucun événement n'a été signalé.

L'ensemble des données a été regroupé dans un cahier d'observation élaboré pour l'étude.

III.4.2. Etude du pouvoir inhibiteur des AINS *ex vivo*

Les échantillons sanguins ont été obtenus par ponction veineuse au pli du coude et, soit immédiatement aliquotés et incubés au bain-marie à 37°C (étude sur COX-1), soit maintenus dans la glace jusqu'à manipulation (étude sur COX-2).

→ *Mesure du pouvoir inhibiteur sur COX-1 plaquettaire*

Avant chaque traitement, après prise unique et à l'état d'équilibre, 2 aliquotes de 1 ml de sang total ont été incubées 1 heure à 37°C au bain-marie dans un tube en verre. Le sérum a été recueilli par centrifugation et conservé à -20°C jusqu'aux dosages du TXB_2 par immunoenzymologie et du médicament étudié par CLHP.

Cette méthode a été retenue après réalisation d'études chez le rat et chez l'homme visant à comparer la production de TXB_2 induite par la formation de thrombine au cours de la coagulation spontanée (1 h à 37° C) et la production stimulée de TXB_2 par l'ionophore calcique A 23187 (50 µM à 37° C pendant 30' ou 24 h d'incubation, et même 30' ou 1 h après 23 h 30 ou 23 h de pré-incubation) comme indicateur de l'activité de COX-1. La production de TXB_2 par le ionophore calcique s'est avérée moins reproductible chez un même sujet que la production de TXB_2 lors de la coagulation spontanée. Bien que le temps d'activation de COX-1 soit plus court (quelques minutes de coagulation) que celui de COX-2 (24 heures), nous avons opté pour la production de TXB_2 pendant la coagulation, en raison, non seulement, de sa meilleure reproductibilité mais aussi parce qu'il s'agit d'un processus physiologique qui est d'ailleurs la méthode la plus souvent employée dans la littérature, ce qui autorise la comparaison de certains résultats.

→ *Mesure du pouvoir inhibiteur sur COX-2 leucocytaire*

Avant chaque traitement, après prise unique, et à l'état d'équilibre, 2 aliquotes de 1 ml de sang total ont été recueillies sur 10 UI d'héparinate de sodium et préincubées 15 minutes à 37°C en présence de 10 µg/ml d'aspirine (inactivation de la COX-1 plaquettaire). Le sang a ensuite été incubé 24 heures à 37°C en présence de 10 µg/ml de LPS d'*Escherichia coli* (O26.B6). Les plasmas ont été recueillis par centrifugation et conservés à -20°C jusqu'au dosage de la PGE_2 par immunoenzymologie.

Cette méthode a été retenue après avoir réalisé des études visant à comparer les résultats de la production d'eicosanoïdes sériques (TXB_2) ou plasmatiques (PGE_2) par ELISA après dilution appropriée des échantillons (du 1/5^e au 1/200^e) dans du tampon EIA et après déprotéinisation des prélèvements par l'acétonitrile ou le méthanol ou encore après extraction des médiateurs sur des mini-colonnes chromatographiques (Sep-pak®, Millipore, France). La dilution avec le tampon EIA s'est évérée être la méthode la plus simple et la plus reproductible.

→ *Mesure des eicosanoïdes urinaires*

Les urines de 24 h ont été recueillies dans des bidons sans conservateur et les aliquotes ont été conservées à -20°C jusqu'au dosage des eicosanoïdes par immunoenzymologie (Cascade Biochem Limited, Bershire, Royaume-Uni pour PGE2; Correlate-EIA, Assay Designs Inc., Ann Arbor, USA pour $PGF_{2\alpha}$). Si la prostaglandine $F_{2\alpha}$ est préférée à la prostaglandine E_2 dont les taux urinaires sont fluctuants chez l'homme, en particulier en raison d'une production séminale, nous avons cependant effectué les 2 dosages. Les taux de prostaglandine E2 et $F_{2\alpha}$ ont été corrigés par la créatininurie par dosage colorimétrique (Procédure n° 555, Sigma Diagnostics, France) pour tenir compte de la capacité excrétrice rénale. La diurèse a été mesurée extemporanément avant congélation des échantillons.

→ *Dosage des médicaments*

La recherche d'une prise occulte d'AINS et le dosage de la concentration totale du médicament étudié, et éventuellement de ses métabolites, ont été réalisés par analyse chromatographique (CLHP) après extraction d'un échantillon de plasma acidifié (Lapicque et al, *J. Chromatogr.*, 1989, 496:301-20).

Le système chromatographique est composé d'une pompe de type 510 avec un détecteur UV à longueur d'onde variable de type 486, associé à une analyse de type informatique effectuée à l'aide du logiciel Millenium de Waters Associates (St Quentin en Yvelines, France).

Pour le dosage proprement dit, on ajoute aux échantillons de plasma ou de serum (200 µL) 1 µg d'acide (benzoyl-4-phenyl)-2-butyrique (Specia, Vitry, France) utilisé comme standard interne. L'ensemble est ensuite extrait avec de l'éther diéthylique (3 mL) après acidification avec 0,1 mL d'acide chlorhydrique 1M. Après évaporation sous flux d'azote, les extraits sont repris par 100 µL de phase mobile constituée d'acétonitrile et d'acide acétique à 0.3%, volume pour volume, puis chromatographiés dans les conditions suivantes: débit de 1 ml/min, séparation sur colonne C18 (100 X 8 mm de diamètre interne) insérée dans un module de compression RCM-10 (Waters), détection des pics à 230 nm pour le diclofénac, 280 nm pour l'ibuprofène et 360 nm pour le méloxicam.

Pour l'ibuprofène, les concentrations des énantiomères *R*- et *S*- ont été mesurées en utilisant la même méthode légèrement modifiée. Les extraits secs ont été dérivatisés selon la même méthode que pour le kétoprofène en ajoutant 100 µL de triéthylamine à 50 mM dans de l'acétonitrile, puis 50µL d'éthylchloroformate à 60 mM (Merck) dans de l'acétonitrile pendant 30 secondes puis 50 µL de L-leucinamide à 1M dans 1M de triéthylamine dans du méthanol pendant 2 minutes à température ambiante (Presle-1998). La réaction a été stoppée en ajoutant 50 µL d'eau distilée. Les échantillons ont ensuite été chromatographiés et élués en utilisant la phase mobile suivante (Na_2HPO_4 50 mM ; acétonitrile ; triéthylamine) où le pH a été ajusté à 7.0 avec de l'acide phosphorique. Les énantiomères ont été détectés à une longueur d'onde de 223 nm.

→ *Fractions libres des AINS*

Les fractions libres des AINS ont été déterminées par la même méthode HPLC après dialyse à l'équilibre. L'équilibre de dialyse a été obtenu sur un appareil Dianorm (Braun ScienceTec, Les Ulis, France), équipé de cellules de 1 mL et de membranes Spectrapor 2 (limites 12 à 14 kDa), à 37°C dans un bain thermostaté. Les échantillons de 1 mL ont été dialysés pendant 3 heures contre 1 mL de tampon phosphate à 67 mmol/L (pH 7), ce temps permettant d'atteindre l'équilibre pour tous les AINS. Les échantillons collectés *ex vivo* après prise d'ibuprofène et *in vitro* avec les AINS ont été analysés après addition de 20 µg/mL de diclofenac, ou de méloxicam ou d'ibuprofène racémique.

→ *Biologie de routine*

Un dosage sérique de la protéine C-réactive, de la créatinine, des enzymes hépatiques et une NFS avec compte plaquettaire ont été réalisés tout au long de l'étude, afin de vérifier l'absence d'effet indésirable biologique des AINS.

III.4.3. Etude du pouvoir inhibiteur des AINS *in vitro*

→ *Mesure du pouvoir inhibiteur sur COX-1[180]*

Avant toute prise d'AINS, le volume sanguin suivant est prélevé: 34,5 ml dont 2,5 ml sur complexon pour NFS. Pour mesurer le pouvoir inhibiteur sur COX-1, des aliquotes de 1 ml de sang total sont incubées 1 heure à 37°C au bain-marie dans des tubes en verre et en présence de différentes concentrations d'AINS. Les AINS ont été dilués dans du DMSO (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) puis déposés dans les tubes sous un volume de 5µl de façon à obtenir des concentrations théoriques finales de 10^{-4} à 10^{-9} M après ajoût de 1 ml de sang. Pour

chaque sujet, une série de 22 aliquotes a été répartie comme suit: quatre aliquotes sans médicament, six aliquotes avec ibuprofène (concentrations finales de 10^{-4} à 10^{-9} M), six aliquotes avec méloxicam (concentrations finales de 10^{-4} à 10^{-9} M), six aliquotes avec diclofénac (concentrations finales de 10^{-4} à 10^{-9} M). Après incubation, les sérums sont recueillis par centrifugation à 2000 tours/minute pendant 10 minutes et conservés à -20°C jusqu'au dosage immunoenzymatique du TXB_2 (métabolite stable du TxA_2) (Cascade Biochem Limited, Bershire, Angleterre). Un tube sec de 10 ml permet de réaliser le dosage des protéines sériques et le screening des AINS (vérification de l'absence de prise occulte).

→ Mesure du pouvoir inhibiteur sur COX-2 [180]

Avant toute prise d'AINS, le volume sanguin suivant est prélevé: 27 ml dont 2,5 ml recueillis sur complexon et 24,5 ml sur héparinate de sodium (10 UI pour 1 ml de sang). Pour mesurer le pouvoir inhibiteur sur COX-2, des aliquotes de 1 ml de sang total hépariné (10 IU d'héparine Choay, France) sont préincubées 15 minutes à 37°C en présence de 10 µg/ml d'aspirine (Sigma, Saint-Quentin fallavier, France) pour inactiver la COX-1 plaquettaire. Les échantillons sont ensuite incubés 24 heures à 37°C en présence de 10 µg/ml de LPS (*Escherichia coli* O26.B6) (Sigma, saint-Quentin fallavier, France) et soit de DMSO seul (5 µl), soit de 5 µl d'une solution de DMSO contenant différentes concentrations d'AINS pour obtenir des concentrations finales de 10^{-4} à 10^{-9} M après ajoût de 1 ml de sang. Pour chaque sujet, une série de 22 aliquotes a été préparée comme suit: quatre aliquotes sans médicament, six aliquotes avec ibuprofène (concentrations finales de 10^{-4} à 10^{-9} M), six aliquotes avec méloxicam (concentrations finales de 10^{-4} à 10^{-9} M), six aliquotes avec diclofénac (concentrations finales de 10^{-4} à 10^{-9} M). Après incubation de 24 heures, les plasmas sont recueillis par centrifugation de 2000 tours/minute pendant 10 minutes et conservés à -20°C

jusqu'au dosage immunoenzymatique de la prostaglandine E_2 (PGE_2) (Cascade Biochem Limited, Bershire, Angleterre).

→ Dosage des médicaments

Nous avons dans un premier temps, vérifié par dosage que la quantité d'AINS présente dans les tubes préaliquotés permettait d'obtenir de manière reproductible des concentrations sanguines finales théoriques de 10^{-4} à 10^{-9} M par ml de sang total.

Les concentrations d'AINS sériques, après coagulation spontanée pour COX-1, et plasmatique, après incubation de 24 heures avec le LPS pour COX-2, ont été déterminées par la même méthode chromatographique que pour l'étude *ex vivo*. Cette mesure chromatographique des AINS ajoutés de manière exogène (quantité connue) a permis d'évaluer la capacité des AINS à se répartir entre les globules rouges et le plasma ou le sérum. En raison des limites de détection de la méthode chromatographique, les concentrations plasmatiques des AINS ont été mesurées pour les échantillons contenant au moins 1 µmole/l d'AINS et le facteur de correction calculé sur les 3 plus importantes concentrations (10^{-6} M ; 10^{-5} M, et 10^{-4} M) a été appliqué à l'ensemble des concentrations (10^{-4} M à 10^{-9} M). Dans l'hypothèse où les AINS ne rentrent pas dans les globules rouges, le facteur correctif suivant [100/(100 – hématocrite)] devrait être utilisé pour convertir les concentrations sanguines totales en concentrations plasmatiques. Les fractions libres des AINS sont déterminées par la même méthode après dialyse à l'équilibre.

III.4.4. Analyse statistique

L'inhibition de TXB_2 et de PGE_2 par les AINS a été calculée sous la forme de pourcentage du niveau de base chez un même sujet. L'inhibition des COXs a été modélisée en utilisant l'équation mathématique analogue à la function de Hill: $Y = [a-d/(1+(X/c)^b] + d$, où X and Y

représentent la concentration molaire et le pourcentage d'inhibition des AINS respectivement; a, b, c et d sont les paramètres de l'équation [48].

Le lissage des résultats expérimentaux a été réalisé par la minimisation de la fonction objective, définie comme la somme des déviations au carré entre la réponse prédite et expérimentale. Le meilleur lissage a été observé pour un poids à 1/Y. Cette équation a été utilisée pour obtenir des courbes sigmoïdes ayant pour abscisse la concentration de l'AINS et en ordonnée la réponse en terme d'inhibition de la production de TXB_2 pour COX-1 et de PGE_2 pour COX-2 afin de calculer les IC_{50} et les IC_{80} (concentrations d'AINS inhibant 50% ou 80% de la production de TXB_2 pour COX-1 et de PGE_2 pour COX-2). Le lissage a été réalisé pour chaque AINS chez chaque patient (24 courbes, 24 IC_{50} et 24 IC_{80}, permettant de définir une moyenne des IC_{50} et des IC_{80}). La moyenne des niveaux d'inhibition pour chaque concentration d'AINS a permis de construire une courbe d'inhibition moyenne et de calculer des IC_{50} et IC_{80} moyennes pour COX-1 et COX-2.

Après avoir exclu un effet séquence par une analyse multivariée de type ANOVA, les résultats *ex-vivo* ont été combinés sans différencier la séquence. Pour chaque AINS, les comparaisons entre prise unique (concentration maximale ou pic) et répétée (concentration équilibre maximale ou pic-équilibre) en termes de concentration plasmatique des AINS et d'inhibition des COXs ont été réalisées avec le test *t* de Student. La limite de significativité statistique a été retenue à 5%.

A partir des courbes *in vitro* d'inhibition des COXs selon la concentration d'AINS dans le sang total des AINS et du facteur de correction érythroplasmatique propre à chaque AINS, des courbes ont été reconstruites individuellement pour les concentrations plasmatiques des AINS. A l'aide de ces courbes plasmatiques et en considérant les concentrations plasmatiques mesurées après prise unique ou répétée des AINS, nous avons déterminé des valeurs théoriques d'inhibition de la synthèse de TXB_2 pour COX-1 et de celle de PGE_2 pour COX-2.

Ces valeurs théoriques ont été calculées à la fois à partir des courbes d'inhibition individuelles et moyennes pour les concentrations mesurées au pic et à l'équilibre. Elles ont ensuite été comparées aux niveaux d'inhibition réellement mesurées *ex-vivo* aux mêmes temps, en utilisant les intervalles de confiance à 95% de la différence relative centrée [(théorique - observée) / observée], les intervalles [-0.25 ; +0.25] étant choisis comme significatifs.

III.4.5. Annexes

III.4.5.a. Note d'informations destinées aux sujets

Monsieur,
Nous vous proposons de participer à une étude visant à comparer la sélectivité d'action, sur les cyclooxygénases (COXs), de trois anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) bien connus et largement utilisés en thérapeutique, le diclofénac (Voltarène® LP), le méloxicam (Mobic®) et l'ibuprofène (Brufen®). Ces molécules vous seront administrées par voie orale, aux posologies recommandées (indications de l'autorisation de mise sur le marché) pour obtenir un effet anti-inflammatoire au long cours.

Pourquoi réaliser cette étude ?
Le but de cette étude est d'étudier le mécanisme d'action de médicaments, les AINS, en considérant que la cible (cyclooxygénase ou COX) sur laquelle ils agissent existe sous deux formes très différentes dans l'organisme. Ainsi, une forme appelée COX-1 serait toujours présente et produirait des substances (prostaglandines) participant au bon fonctionnement de l'organisme. En revanche, l'autre forme appelée COX-2 serait présente en situation pathologique et produirait un excès de prostaglandines participant aux maladies. Sur la base de ces différences, il semble possible de séparer les effets bénéfiques des AINS sur les maladies de leurs effets indésirables sur l'organisme. En effet, leurs effets bénéfiques (diminution de la douleur par exemple) seraient dus majoritairement à une action (diminution d'activité) sur COX-2 tandis que leurs effets indésirables digestifs ou rénaux seraient dus majoritairement à une action (diminution d'activité) sur COX-1. Des cultures de cellules humaines ou animales ont été utilisées pour étudier la diminution d'activité de COX-1 et de COX-2 par les AINS. Ceci a permis de comparer les médicaments selon leur action préférentielle (ou «sélectivité») sur COX-1 ou COX-2. Cependant, aucune culture de cellules ne reproduit la complexité de l'organisme, de sorte que l'on ignore actuellement les niveaux de diminution d'activité de COX-1 et de COX-2 lorsque les AINS sont prescrits chez l'homme. C'est pourquoi nous souhaitons comparer 3 AINS qui ont, dans des cultures de cellules, des comportements différents vis à vis de COX-1 et de COX-2 afin de vérifier si ces différences sont retrouvées chez l'homme en situation de prescription médicamenteuse.

Comment se déroule l'étude ?
Cette étude, d'une durée totale de 23 jours, comporte 6 visites, dans le service de Rhumatologie (Hôpital de Brabois, 5ème étage).

Lors de votre première visite, nous vous demanderons de remplir un questionnaire (âge, taille, poids, tabagisme, antécédents médicaux, affiliation à un régime de sécurité sociale) et vous bénéficierez d'un examen clinique avec prise de la pression artérielle, mesure de la fréquence cardiaque, électrocardiogramme, au terme duquel votre médecin vous proposera de participer ou non à cette étude.

En particulier, nous ne pourrez pas participer à cette étude si vous présentez des antécédents: d'allergie avérée aux AINS (notamment survenue de crises d'asthme après prise d'aspirine), d'ulcère gastroduodénal, de hernie hiatale ou d'hémorragie digestive ou une insuffisance hépatocellulaire ou rénale sévères ou que vous êtes porteurs d'un lupus érythémateux disséminé. De la même manière, vous ne pourrez pas participer à cette étude si vous bénéficiez d'un traitement par l'un des médicaments suivants qui sont une source potentielle d'interaction médicamenteuse: autre AINS, aspirine, anticoagulants oraux, héparines, sulfamides hypoglycémiants, sels de lithium, ticlopidine, methotrexate, diurétiques, antihypertenseurs (ß-bloquants, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine), digoxine.

En cas de participation à cette étude, nous réaliserons un prélèvement urinaire et sanguin afin de contrôler l'absence de prise récente d'anti-inflammatoires. L'étude consiste à prendre successivement les trois traitements par anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) selon un ordre défini au hasard. Les AINS seront pris par voie orale, accompagnés d'un grand verre d'eau, selon les schémas posologiques suivants: un comprimé à 7,5 mg de méloxicam à 8 h pendant 5 jours; un comprimé à 400 mg d'ibuprofène à 8 h, à 12 h et à 20 h pendant 2 jours puis un comprimé à 400 mg d'ibuprofène à 8 h le troisième jour; un comprimé à 75 mg de diclofénac à 8 h pendant 3 jours. Entre deux traitements successifs sera réalisée une fenêtre thérapeutique (période d'arrêt de toute prise médicamenteuse) de 7 jours après traitement par le méloxicam, de 2 jours après traitement par ibuprofène et diclofénac.

Un recueil des urines de 24 heures vous sera demandé avant chaque traitement anti-inflammatoire (soit 3 recueils) et après 5 jours de traitement par méloxicam, 4 jours de traitement par ibuprofène et 3 jours de traitement par diclofénac (soit 3 recueils). Nous aurez une prise de sang avant chaque nouveau cycle thérapeutique (soit 3 prélèvements), au pic de concentration sanguine du médicament (5 h 30 après la première prise de méloxicam, 2 h 30 après la première prise d'ibuprofène, 3 h 30 après la première prise de diclofénac) (soit 3 prélèvements) et à l'état d'équilibre pharmacocinétique de chaque anti-inflammatoire (après 5 jours de traitement par méloxicam, 2 jours de traitement par ibuprofène et 3 jours de traitement par diclofénac) (soit 3 prélèvements). L'ensemble de ces prélèvements correspond donc à 6 recueils d'urines de 24 heures et 9 prises de sang représentant un volume total de 125 ml collectés sur une durée d'environ 3 semaines.

Indemnité de participation à l'étude

Votre participation jusqu'au terme de cette étude sans bénéfice individuel direct vous vaudra le versement d'une indemnité de 2000 Francs.

Quels sont les risques ou les effets secondaires ?

La tolérance et l'efficacité de ces 3 anti-inflammatoires non stéroïdiens sont parfaitement connues. Ces 3 médicaments sont habituellement bien tolérés, d'autant que les doses administrées dans cette étude sont celles recommandées par le laboratoire, que la durée de traitement est courte (5 jours pour le méloxicam, 2 jours pour l'ibuprofène et 3 jours pour le diclofénac) et qu'une période d'élimination totale de l'anti-inflammatoire précédent est respectée entre chaque cycle thérapeutique. Cependant, quelques effets indésirables peuvent survenir tels que: manifestations digestives (nausées, vomissements, gastralgies, dyspepsie,

saignements mineurs, troubles du transit), quelques réactions d'hypersensibilité dermatologiques (rash, éruptions, prurit, œdème), de rares manifestations respiratoires (asthme), neurologiques (céphalées, étourdissements, vertiges), troubles de la vue, hépatiques (augmentation transitoire des transaminases), rénales (insuffisance rénale), hématologiques (agranulocytose, anémie hémolytique). Comme pour tous les anti-inflammatoires non stéroïdiens, la survenue de ces effets indésirables est fréquemment associée à une prise prolongée d'AINS ou à l'existence d'un terrain particulier qui sera dépisté lors de l'inclusion. Ces effets indésirables seront sytématiquement recherchés au cours des visites médicales prévues dans l'étude.

Que deviennent les informations recueillies dans cette étude ?

Les informations provenant de cet essai ont pour objectif de valider une méthode d'évaluation biologique des AINS commercialisés ou en passe de l'être.

Toutes les informations recueillies dans votre dossier médical et en rapport avec l'essai seront traitées de façon confidentielle et feront l'objet d'un traitement informatique auquel vous pourrez avoir accès par l'intermédiaire du médecin responsable.

Votre identité restera couverte par le secret médical. Les résultats de cette étude pourront paraître dans des publications ou être présentés à des congrès, en respectant, bien entendu, l'anonymat des personnes.

Quels sont vos droits ?

Il est bien entendu qu'à n'importe quel moment de l'étude, vous pourrez décider de ne plus y participer.

Si vous subissez un dommage en relation directe avec votre participation à l'essai, votre traitement médical serait pris en charge par le CHU de Nancy (Hôpitaux de Brabois), promoteur de cet étude.

Le CHU de Nancy, promoteur de cet étude a souscrit un contrat d'assurance, conformément aux textes en vigueur, répondant aux critères de garantie définis pour les recherches biomédicales et la protection des patients.

Une déclaration de cette essai a été effectuée auprès du Ministère de la Santé.

Conformément à la législation en vigueur, le protocole de cette étude a reçu l'avis favorable du Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nancy, lors de sa délibération du 19 août 1997 .

III.4.5.b. Formulaire de consentement éclairé écrit

Lettre PATIENT: |___|

CONSULTATION D'ADMISSION DANS L'ETUDE

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE ECRIT DE

Monsieur: **NOM =** **Prénom =**
né le: / /
Adresse:

Le Docteur Hubert BLAIN m'a proposé de participer à l'étude:

Sélectivité d'inhibition des cyclooxygénases (COXs) par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) *in vitro* et en conditions de prescription

Il m'a précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser ma participation à cet essai.

Afin d'éclairer ma décision, j'ai lu et bien compris les informations qui se trouvent dans ce document et pris, en particulier, connaissance de l'absence de bénéfice individuel direct, de la nature et la posologie des médicaments administrés et de la possibilité de survenue d'effets indésirables.

Mon consentement ne décharge en rien les investigateurs de cette étude de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Je consens librement à participer à l'étude ci-dessus mentionnée.

Je me réserve le droit, à tout moment, d'interrompre ma participation à cette étude en en fournissant les raisons au médecin responsable, sans que cela ne me porte préjudice et sans supporter aucune responsabilité.

J'accepte que, compte tenu des nécessités de la recherche, les données enregistrées à l'occasion de cet essai puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur ou pour son compte. Les données recueillies demeureront strictement confidentielles. Je n'autorise leur

consultation que par la personne mandatée à cet effet par le Médecin ci-dessus mentionné et éventuellement par un représentant des autorités de la Santé tenu au secret professionnel.

A tout moment, je pourrai demander des informations complémentaires et exercer mon droit de rectification auprès du Médecin ci-dessus dénommé qui a recueilli mon consentement éclairé et écrit.

Fait à , le

Signature du patient

Signature du médecin

Nom:

Adresse:

Tél: Fax:

III.5. Résultats

III.5.1. Observance, tolérance

Aucun effet indésirable n'a été rapporté au cours de l'étude. Les 24 volontaires ont poursuivi l'étude jusqu'à son terme. Les données clinico-biologiques des patients inclus et les séquences de prises des AINS apparaissent dans le tableau 5.

Patient	Age (ans)	Poids (kg)	Taille (cm)	Séquence
B	23,3	52	172	Ibu/Diclo/Melox
C	26.7	72	180	Diclo/Ibu/Melox
D	24,3	58	160	Melox/Diclo/Ibu
E	23,3	96	193	Diclo/Ibu/Melox
F	24,3	61	170	Ibu/Melox/Diclo
G	20,6	65	169	Melox/Ibu/Diclo
H	25,7	78	189	Diclo/Ibu/Melox
I	24,6	78	194	Ibu/Diclo/Melox
J	25,6	67	175	Ibu/Diclo/Melox
K	23,9	75	180	Melox/Diclo/Ibu
L	21	55	179	Ibu/Melox/Diclo
M	21	66	184	Diclo/Ibu/Melox
N	19,5	75	180	Melox/Ibu/Diclo
O	20,7	59	171	Melox/Diclo/Ibu
P	20,3	59	184	Diclo/Melox/Ibu
Q	21	70	184	Melox/Ibu/Diclo
R	22,5	70	178	Ibu/Melox/Diclo
S	24	82	187	Ibu/Melox/Diclo
T	22	65	180	Melox/Diclo/Ibu
U	21,7	65	183	Diclo/Melox/Ibu
V	21	65	179	Diclo/Melox/Ibu
W	24,3	79	190	Ibu/Diclo/Melox
Y	21,1	73	184	Melox/Ibu/Diclo
Z	22	67	177	Diclo/Melox/Ibu

Tableau 5: Données démographiques des sujets

L'observance, qui a été contrôlée par un appel téléphonique des sujets, s'est avérée excellente d'après les dosages effectués sur les échantillons plasmatiques.

Aucune variation significative des paramètres biologiques étudiés (enzymes hépatiques, créatininémie, protéine C-réactive, hématocrite, numérations sanguine et plaquettaire) n'a été observée au cours de l'étude.

III.5.2. Dosage des médicaments – relations sang total/plasma

Le dosage des médicaments sur les échantillons de l'étude *in vitro* a permis de confirmer l'impossibilité de quantifier les molécules en deçà de 10^{-7} M, ce qui n'est pas rédhibitoire compte tenu des IC_{50} bien supérieures des AINS, de valider directement les fortes concentrations utilisées (10^{-4}M à 10^{-6}M) et de montrer que les 3 AINS ne se répartissent pas uniformément entre les compartiments plasmatique et cellulaire. Si l'on considère que les AINS sont confinés dans l'espace extra-cellulaire et que l'hématocrite est de 45 % (valeurs utilisées par certains auteurs pour corriger les concentrations d'AINS sur sang total en concentrations plasmatiques), le facteur de transformation des concentrations sanguines en concentrations plasmatiques devrait être égal à 1.85 (100/100 – hématocrite). Si l'hématocrite moyen était bien égal à 44 % dans notre étude, les concentrations mesurées dans le plasma ont permis de calculer des facteurs de correction égaux à 1,65 ± 0,24 pour l'ibuprofène, 1,34 ± 0,20 pour le diclofénac et 1,49 ± 0,13 pour le méloxicam. Bien que peu différents les uns des autres, ces facteurs correcteurs montrent que les 3 AINS ne se répartissent pas exactement de la même façon entre le plasma et les cellules *in vitro*.

Le dosage total des médicaments sur les échantillons de l'étude *ex vivo* a permis de montrer qu'aucun des patients n'a consommé de façon occulte d'autres AINS que ceux à l'étude, de vérifier que les concentrations plasmatiques mesurées après prise unique ou répétée (voir Tableau 6) sont comparables aux données pharmacocinétiques de la littérature, ce qui confirme que les temps de prélèvement que nous avons choisis sont assez proches des T*max*.

Le dosage total des médicaments sur les échantillons de l'étude *ex vivo* a permis, en outre, de confirmer que le méloxicam a un comportement distinct des 2 autres AINS d'un point de vue pharmacocinétique, avec un facteur d'accumulation de 1,8 (augmentation des taux circulants entre prise unique et répétée). Par ailleurs, une mauvaise observance a été suspectée sur seulement 4 prélèvements pour lesquels l'absence ou des taux anormalement bas de médicament ont été mesurés après prise unique (patients G et T après prise de diclofénac) ou répétée (patient D après prise de diclofénac, patient Z après prise d'ibuprofène).

DICLOFENAC		**IBUPROFENE**		**MÉLOXICAM**	
Concentration Prise unique µg/mL	**Concentration Prise répétée** µg/mL	**Concentration Prise unique** µg/mL	**Concentration Prise répétée** µg/mL	**Concentration Prise unique** µg/mL	**Concentration Prise répétée** µg/mL
0,38 ± 0,35	0,27 ± 0,18	24,0 ± 8,0	14,8 ± 5,9	0,62 ± 0,13	1,09 ± 0,37

Tableau 6: Concentrations plasmatiques mesurées après prise orale unique ou répétée d'AINS.

Le dosage de la fraction libre des médicaments (*in vitro* pour tous les AINS, *ex vivo* directement sur les échantillons plasmatiques pour l'ibuprofène et sur des échantillons surchargés *ex vivo* pour les autres AINS) a permis de montrer que la fraction libre est identique *in vitro* et *ex vivo* pour l'ibuprofène, ce qui est compatible avec une participation comparable des énantiomères dans ces 2 circonstances, et de confirmer que la fraction libre évolue de façon parallèle à la concentration totale, ce qui n'est pas surprenant chez des volontaires sains mais suggère que la fixation protéique est linéaire aux concentrations rencontrées. De plus, la fraction libre de *S*-(+)-ibuprofène augmente de façon proportionnelle au rapport des concentrations totales des 2 énantiomères *S*-(+)/*R*-(-), ce qui suggère qu'il reflète davantage l'inversion chirale (transformation unidirectionnelle du *R*-(-) en *S*-(+) *via* la formation de thio-

ester du cœnzyme A) que la fixation stéréosélective des énantiomères sur les protéines plasmatiques.

Le dosage stéréosélectif de l'ibuprofène *ex vivo* a permis de montrer que le rapport des 2 énantiomères [*S*-(+)/*R*-(-)] varie beaucoup entre les individus (valeurs extrêmes de 0,87 à 3,89), ce qui met en évidence la variabilité de cette inversion chirale. De plus, le rapport des 2 énantiomères [*S*-(+)/*R*-(-)] augmente avec la répétition de la prise du médicament (1.45 ± 0.41 *vs* 2.18 ± 1.03), ce qui souligne la prépondérance du rôle de l'énantiomère *S*-(+) à l'état d'équilibre.

III.5.3. Mesure du pouvoir inhibiteur *in vitro*: courbes dose-réponse

→ L'étude de la production d'eicosanoïdes *in vitro* montre qu'il existe une variabilité intra-individuelle de 26 ± 18 % pour COX-1 et 18 ± 13 % pour COX-2, sur la production basale des TXB_2 (COX-1 plaquettaire, 391± 153 ng/mL) ou stimulée de PGE_2 (COX-2 leucocytaire, 77 ± 28 ng/mL) d'eicosanoïdes mesurée en 3 circonstances chez tous les individus. En outre, il existe une variabilité inter-individuelle de 39 % pour COX-1 et 36 % pour COX-2, sur la production basale (COX-1 plaquettaire) ou stimulée (COX-2 leucocytaire) d'eicosanoïdes.

Les pouvoirs inhibiteurs respectifs sur les COXs varient d'un individu à l'autre dans ce système, comme l'illustre la variation des IC_{50} observée sur une même activité enzymatique (tableau 7).

En corollaire, le profil de sélectivité des AINS vis-à-vis des COXs varie beaucoup d'un individu à l'autre dans ce système, puisque l'écart-type est supérieur à la moyenne des indices de sélectivité pour les 3 AINS.

PATIENT	DICLOFENAC		IBUPROFENE		MÉLOXICAM	
	IC_{50} COX1 [M]	IC_{50} COX2 [M]	IC_{50} COX1 [M]	IC_{50} COX2 [M]	IC_{50} COX1 [M]	IC_{50} COX2 [M]
B	$1,08\ 10^{-7}$	$8,46\ 10^{-8}$	$4,45\ 10^{-7}$	$1,35\ 10^{-5}$	$4,70\ 10^{-7}$	$6,55\ 10^{-7}$
C	$2,56\ 10^{-7}$	$7,82\ 10^{-8}$	$2,52\ 10^{-6}$	$5,76\ 10^{-6}$	$2,54\ 10^{-6}$	$1,82\ 10^{-7}$
D	$1,87\ 10^{-7}$	$3,98\ 10^{-8}$	$4,69\ 10^{-6}$	$7,23\ 10^{-6}$	$4,19\ 10^{-6}$	$6,12\ 10^{-7}$
E	$4,11\ 10^{-7}$	$5,55\ 10^{-8}$	$4,11\ 10^{-6}$	$6,82\ 10^{-6}$	$2,68\ 10^{-6}$	$2,63\ 10^{-7}$
F	$1,44\ 10^{-7}$	$7,19\ 10^{-9}$	$8,30\ 10^{-6}$	$1,65\ 10^{-5}$	$1,17\ 10^{-6}$	$5,87\ 10^{-7}$
G	$9,51\ 10^{-8}$	$1,72\ 10^{-8}$	$3,97\ 10^{-6}$	$2,51\ 10^{-6}$	$6,7910^{-6}$	$6,95\ 10^{-7}$
H	$8,88\ 10^{-7}$	$1,44\ 10^{-7}$	$1,84\ 10^{-5}$	$4,22\ 10^{-6}$	$9,6710^{-6}$	$5,17\ 10^{-7}$
I	$2,45\ 10^{-7}$	$6,69\ 10^{-8}$	$1,6710^{-5}$	$1,70\ 10^{-6}$	$1,08\ 10^{-6}$	$1,79\ 10^{-7}$
J	$7,36\ 10^{-8}$	$3,15\ 10^{-8}$	$5,78\ 10^{-6}$	$2,82\ 10^{-6}$	$8,19\ 10^{-7}$	$1,23\ 10^{-7}$
K	$4,55\ 10^{-8}$	$1,12\ 10^{-7}$	$5,59\ 10^{-6}$	$6,08\ 10^{-5}$	$1,2910^{-6}$	$4,22\ 10^{-6}$
L	$1,30\ 10^{-7}$	$2,60\ 10^{-8}$	$6,04\ 10^{-6}$	$9,84\ 10^{-5}$	$2,07\ 10^{-7}$	$2,82\ 10^{-7}$
M	$7,28\ 10^{-7}$	$2,20\ 10^{-8}$	$6,18\ 10^{-6}$	$6,42\ 10^{-5}$	$4,77\ 10^{-6}$	$3,10\ 10^{-7}$
N	$1,91\ 10^{-7}$	$1,26\ 10^{-8}$	$1,04\ 10^{-5}$	$8,07\ 10^{-6}$	$1,69\ 10^{-6}$	$4,81\ 10^{-7}$
O	$1,61\ 10^{-7}$	$1,00\ 10^{-8}$	$1,83\ 10^{-6}$	$2,45\ 10^{-6}$	$8,52\ 10^{-7}$	$7,79\ 10^{-7}$
P	$2,38\ 10^{-7}$	$1,77\ 10^{-7}$	$7,16\ 10^{-7}$	$3,86\ 10^{-5}$	$7,48\ 10^{-7}$	$8,88\ 10^{-7}$
Q	$5,9410^{-8}$	$6,08\ 10^{-8}$	$9,39\ 10^{-7}$	$6,54\ 10^{-6}$	$5,84\ 10^{-8}$	$7,55\ 10^{-7}$
R	$1,94\ 10^{-7}$	$1,74\ 10^{-7}$	$2,24\ 10^{-6}$	$3,06\ 10^{-5}$	$2,49\ 10^{-6}$	$1,22\ 10^{-6}$
S	$1,31\ 10^{-7}$	$3,75\ 10^{-8}$	$1,17\ 10^{-5}$	$1,40\ 10^{-5}$	$2,49\ 10^{-6}$	$3,25\ 10^{-7}$
T	$4,38\ 10^{-7}$	$1,40\ 10^{-8}$	$4,09\ 10^{-6}$	$2,37\ 10^{-5}$	$6,69\ 10^{-6}$	$4,11\ 10^{-7}$
U	$7,75\ 10^{-7}$	$8,30\ 10^{-8}$	$8,93\ 10^{-6}$	$8,58\ 10^{-6}$	$2,44\ 10^{-6}$	$8,41\ 10^{-8}$
V	$7,97\ 10^{-7}$	$8,96\ 10^{-8}$	$4,20\ 10^{-6}$	$1,87\ 10^{-5}$	$2,12\ 10^{-6}$	$4,64\ 10^{-7}$
W	$6,02\ 10^{-7}$	$8,59\ 10^{-9}$	$4,14\ 10^{-6}$	$1,00\ 10^{-5}$	$6,11\ 10^{-6}$	$1,79\ 10^{-8}$
Y	$6,11\ 10^{-7}$	$2,64\ 10^{-8}$	$1,52\ 10^{-6}$	$2,38\ 10^{-6}$	$4,16\ 10^{-7}$	$1,18\ 10^{-7}$
Z	$4,30\ 10^{-7}$	$2,83\ 10^{-8}$	$1,17\ 10^{-5}$	$3,93\ 10^{-6}$	$1,68\ 10^{-6}$	$3,18\ 10^{-7}$
moyenne des IC_{50s}	$3,48\ 10^{-7} \pm 2,59\ 10^{-7}$	$5,86\ 10^{-8} \pm 5,08\ 10^{-8}$	$6,05\ 10^{-6} \pm 4,82\ 10^{-6}$	$1,99\ 10^{-5} \pm 2,40\ 10^{-5}$	$2,64\ 10^{-6} \pm 2,49\ 10^{-6}$	$6,00\ 10^{-7} \pm 8,20\ 10^{-7}$
moyenne des ratios d'IC_{50} 2/1	$0,17 \pm 0,29$		$3,29 \pm 5,14$		$0,23 \pm 0,24$	

Tableau 7: Pouvoir inhibiteur des AINS sur les COXs mesuré *in vitro* chez les 24 volontaires

→ Le lissage mathématique à l'aide de l'équation de Hill (cf Figure 1) a permis de distinguer les 3 AINS, puisque:

- l'ibuprofène inhibe préférentiellement COX-1 (2 à 3 fois plus efficacement que COX-2) alors que le diclofénac et le méloxicam inhibent préférentiellement COX-2 (4 à 6 fois plus efficacement que COX-1) si l'on prend en considération le rapport des IC_{50},

- le diclofénac apparaît comme un inhibiteur plus sélectif de COX-2 que le méloxicam, si l'on prend en considération le rapport des IC_{80} (voir tableau 8) ou si l'on estime, de façon plus pragmatique, ce que serait le niveau d'inhibition de COX-1 quand COX-2 serait inhibée de 80

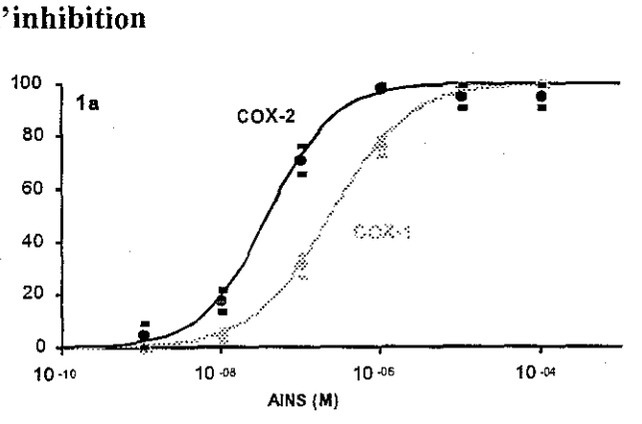
% (seuil proposé par certains auteurs comme étant le garant d'un effet anti-inflammatoire): 30 % pour le diclofénac, et 51 % pour le méloxicam (pour mémoire, 86 % pour l'ibuprofène),

- le diclofénac est un inhibiteur plus puissant des COXs que le méloxicam (6 à 7 fois sur COX 1, 8 à 10 fois sur COX-2), bien que les 2 AINS aient des profils de sélectivité assez proches,

AINS	*COX-1*		*COX-2*		*COX-2/COX-1*[a]		*COX-1*		*COX-2*		*COX-2/COX-1*[b]	
	IC_{50}[a] µM	IC_{80}[a] µM	IC_{50}[a] µM	IC_{80}[a] µM	IC_{50}	IC_{80}	IC_{50}[b] µM	IC_{80}[b] µM	IC_{50}[b] µM	IC_{80}[b] µM	IC_{50}	IC_{80}
Diclofénac	0,35 ± 0,26	1,32 ± 0,10	0,06 ± 0,05	0,13 ± 0,08	*0,17*	*0,10*	0,25	1,17	0,04	0,16	*0,16*	*0,13*
Ibuprofène	6,05 ± 4.82	27,0 ± 15.90	19,90 ± 24.01	221,0 ± 710.0	*3,29*	*8,19*	4,30	40,80	10,00	74,90	*2,.33*	*1,84*
Méloxicam	2,64 ± 2,49	8,92 ± 8,68	0,60 ± 0,82	2,51 ± 2,04	*0,23*	*0,28*	1,60	12,30	0,31	4,16	*0,19*	*0,34*

Tableau 8: Indices sélectivité des AINS vis-à-vis des COXs calculés in vitro.
Résultats exprimés sous la forme des concentrations inhibant l'activité cyclo-oxygénasique de 50% [IC50] ou 80% [IC80]. (a) résultats obtenus par la moyenne arithmétique ± écart-type des valeurs individuelles d'IC50 ou d'IC80. (b) résultats obtenus à partir de la courbe dose-réponse moyenne.

- les indices de sélectivité calculés par le lissage des courbes individuelles ou par la courbe moyenne sont assez proches (voir tableau 8), ce qui n'est pas surprenant dans la mesure ou tous les individus ont participé de façon équivalente à la construction de cette courbe dose-réponse.



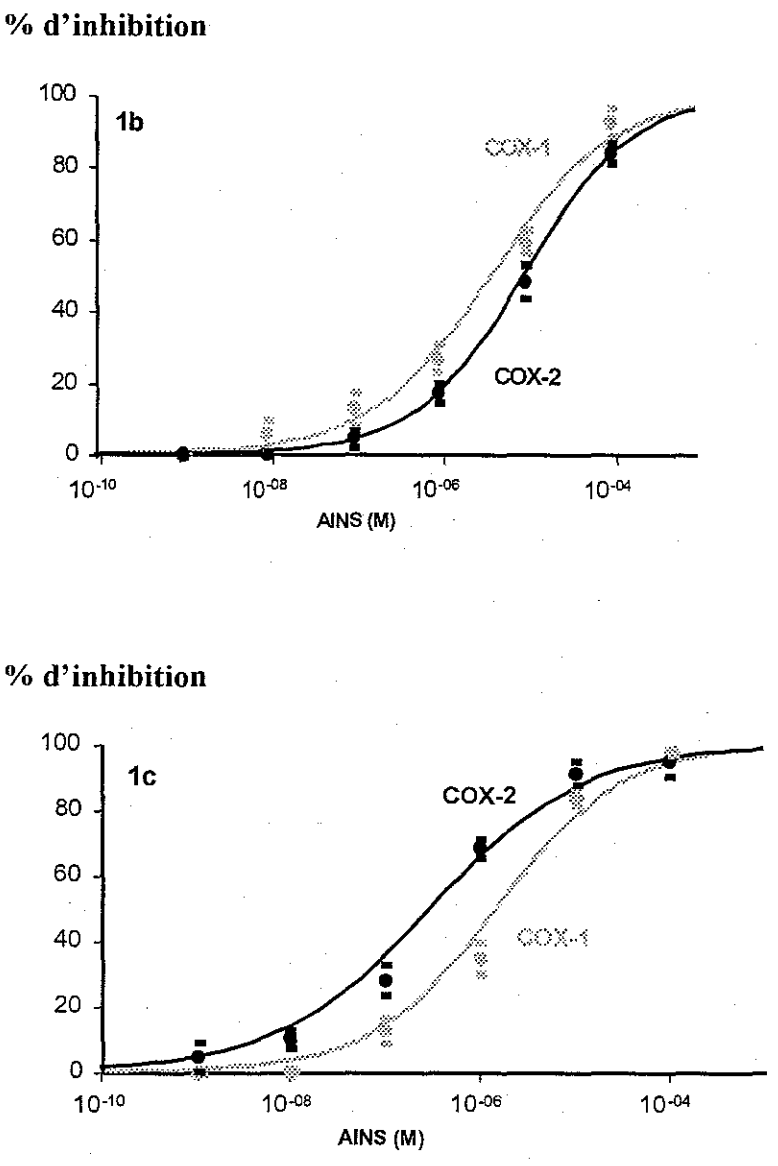


Figure 1: Courbes d'inhibition des iso-enzymes sanguines de COXs par les AINS *in vitro*. *1a)* diclofénac ; *1b)* ibuprofène ; *1c)* méloxicam (courbes établies à partir des données recueillies chez les 24 volontaires sains de l'étude).

III.5.4. Mesure du pouvoir inhibiteur *ex vivo*

Les résultats de l'étude du pouvoir inhibiteur sur les COXs mesuré *ex vivo* dans le sang total après prise orale séquentielle des 3 AINS apparaissent dans les tableaux 9 et 10.

PATIENT	DICLOFENAC		IBUPROFENE		MÉLOXICAM	
	Prise unique	**Prise répétée**	**Prise unique**	**Prise répétée**	**Prise unique**	**Prise répétée**
B	6,4 %	79,3 %	0,9 %	1,1 %	40,3 %	21,4 %
C	29,2 %	30,1 %	4,9 %	14,5 %	75,9 %	49,6 %
D	4,9 %	*55,8 %*	1,5 %	4,5 %	86,5 %	31,1 %
E	29,8 %	28,7 %	8,4 %	6 %	66 %	63,5 %
F	3,8 %	26 %	3,0 %	12,1 %	49,2 %	26,5 %
G	*96,9 %*	37,9 %	9,3 %	7,9 %	90,0 %	17,8 %
H	23,8 %	17,2 %	5,1 %	12,5 %	62,7 %	54,2 %
I	7,7 %	41,7 %	4,3 %	3,8 %	71,1 %	68 %
J	6,1 %	26,6 %	0,6 %	0,9 %	43,7 %	46,8 %
K	46,2 %	9,4 %	5,8 %	2,5 %	86,1 %	28,9 %
L	36,4 %	8,2 %	6,8 %	11,7 %	80,5 %	52,5 %
M	12,1 %	14,1 %	6,3 %	12,7 %	84 %	72,3 %
N	28,7 %	34,5 %	7,7 %	15,9 %	69,1 %	21,8 %
O	25,1 %	26,3 %	1,6 %	5,3 %	83,6 %	47,3 %
P	47,2 %	20,6 %	3,7 %	4,7 %	62,6 %	33,3 %
Q	41,7 %	37,1 %	2,1 %	6,6 %	57 %	23 %
R	27,5 %	17,6 %	7,5 %	8,6 %	72,5 %	57,4 %
S	20,2 %	38,5 %	8,0 %	15 %	36,7 %	88,6 %
T	*60,9 %*	9,3 %	1,3 %	4,0 %	88,1 %	28,5 %
U	55,8 %	61,4 %	4,0 %	11,0 %	84,2 %	57 %
V	29,2 %	37,3 %	2,5 %	2,5 %	92,5 %	46,1 %
W	58,6 %	3,6 %	0,7 %	0,6 %	64,1 %	72,6 %
Y	9,1 %	20 %	2,7 %	2,1 %	69,3 %	16,8 %
Z	29,9 %	12 %	4 %	*79,7 %*	63,9 %	54,1 %
Moyenne ± écart type	30,72 ± 22,37 %	28,88 ± 18,18 %	4,28 ± 2,69 %	10,26 ± 15,57 %	69,98 ± 16,13 %	44,96 ± 19,95 %
Inhibition moyenne	69,3 %	71,1 %	95,7 %	89,7 %	30,0 %	55,0 %

Tableau 9: Activité résiduelle de COX-1 mesurée après prise orale des AINS dans un ordre aléatoire.

XX % = valeur pour laquelle le dosage du médicament suggère une mauvaise observance

PATIENT	DICLOFENAC		IBUPROFENE		MELOXICAM	
	Prise unique	**Prise répétée**	**Prise unique**	**Prise répétée**	**Prise unique**	**Prise répétée**
B	0,3 %	0,7 %	2,7 %	1,4 %	40,5 %	9,8 %
C	3,4 %	21,4 %	56,6 %	40,5 %	35,3 %	38,6 %
D	0,2 %	*17,1 %*	27,6 %	12,2 %	26,6 %	6 %
E	1,2 %	0,8 %	5,5 %	6,6 %	10,9 %	5,4 %
F	0,8 %	2,1 %	9,2 %	29,9 %	27,3 %	9,4 %
G	*19,8 %*	0,8 %	20,6 %	31,8 %	15,6 %	9,8 %
H	0,8 %	0,3 %	10,2 %	21,4 %	54,8 %	29,2 %
I	0,3 %	0,6 %	20,6 %	7 %	35,2 %	14,3 %
J	0,3 %	0,3 %	17,8 %	12,1 %	26,4 %	13,9 %
K	2,4 %	0,2 %	8,7 %	6,7 %	29,3 %	18,3 %
L	0,4 %	0,4 %	5,2 %	21,6 %	38,3 %	7,7 %
M	0,7 %	1,3 %	15,2 %	6,5 %	57,3 %	10,5 %
N	0,6 %	0,9 %	13,7 %	16,2 %	57,1 %	27 %
O	1,0 %	1,4 %	4,7 %	7,3 %	25,3 %	13,9 %
P	9,9 %	0,2 %	31,6 %	46 %	38 %	23,2 %
Q	0,7 %	0,2 %	12,7 %	9,1 %	36,8 %	5,7 %
R	0,4 %	0,3 %	26,5 %	35,5 %	26,9 %	45,6 %
S	2,3 %	5,0 %	12,4 %	88,3 %	73 %	51,4 %
T	*76,2 %*	1 %	17,5 %	13,5 %	18,8 %	11,3 %
U	1,7 %	0,7 %	8 %	56,9 %	17,5 %	6,1 %
V	0,7 %	0,6 %	12,5 %	17,5 %	40,3 %	5,5 %
W	0,7 %	0,4 %	18,5 %	29,4 %	42,9 %	17,2 %
Y	2,8 %	3,4 %	29,8 %	16,1 %	38,1 %	19 %
Z	0,9 %	0,4 %	20,2 %	*49,2 %*	65,2 %	8,1 %
Moyenne ± écart type	5,35 ± 15,67 %	2,52 ± 5,31 %	17,0 ± 11,69 %	24,28 ± 20,47 %	36,56 ± 15,81 %	16,95 ± 12,89 %
Inhibition moyenne	94,6 %	97,5 %	83,0 %	75,7 %	63,4 %	83,0 %

Tableau 10: Activité résiduelle de COX-2 mesurée après prise orale des AINS dans un ordre aléatoire. (*XX %* = valeur pour laquelle le dosage du médicament suggère une mauvaise observance

→ Si l'on ne prend pas en considération les prélèvements pour lesquels un défaut d'observance est noté d'après les taux circulants d'AINS, les niveaux d'inhibition observés sont les suivants:

AINS (posologie)	**Inhibition de COX-1 (%)**		**Inhibition de COX-2 (%)**	
	Prise unique	**Prise répétée**	**Prise unique**	**Prise répétée**
Diclofénac (75mg/j)	69 ± 22	71 ± 18	95 ± 16	97 ± 5
Ibuprofène (400mg *t.i.d*)	96 ± 3	90 ± 16	83 ± 12	76 ± 20
Méloxicam (7.5 mg/j)	30 ± 16	55 ± 20 *	63 ± 16	83 ± 13 *

Tableau 11: Niveau moyen d'inhibition des COXs après prise orale d'AINS. Résultats exprimés sous la forme moyenne ± écart-type; * $p < 0.05$ *versus* prise unique

→ Ces résultats montrent clairement que le degré d'inhibition varie d'un patient à l'autre pour un même AINS, même si ces résultats doivent être interprétés en tenant compte des éventuelles variations pharmacocinétiques (retard d'absorption, état de vacuité gastrique par exemple) puisqu'il s'agit de mesures effectuées à un temps fixe et non d'une cinétique complète de l'inhibition. Cette variabilité de réponse inter-individuelle n'est pas attribuable, *a priori*, à des différences d'origine hématologique puisque le volontaires sains étaient homogènes en termes de numérations leucocytaire et plaquettaire et d'hématocrite, et qu'aucune modification significative de ces paramètres n'a été observée au cours de l'essai. Les 3 AINS inhibent les iso-enzymes des COXs avec des profils différents en ce qui concerne:

- la cinétique d'apparition du pouvoir inhibiteur puisqu'un niveau d'inhibition quasi identique est observé après prise unique ou répétée de diclofénac ou d'ibuprofène, alors qu'il existe une augmentation significative du niveau d'inhibition avec la répétition des prises pour le méloxicam,
- la sélectivité d'inhibition puisqu'une inhibition plus marquée de COX-1 que de COX-2 est observée pour l'ibuprofène alors qu'il existe une inhibition équilibrée des 2 COXs mais avec une efficacité supérieure sur COX-2 pour le diclofénac et une inhibition préférentielle de COX-2 pour le méloxicam principalement après prise unique du médicament.

→ Il existe un bonne cohérence entre les inhibitions particulièrement faibles des COXs et les taux anormalement bas, voire nuls, d'AINS mesurés chez certains patients (patients G et T après prise unique de diclofénac ; patient D après prise répétée de diclofénac, patient Z après prise répétée d'ibuprofène). Il existe cependant chez quelques patients (en 4 occasions dans le groupe méloxicam), une inhibition faible des COXs malgré des taux circulants d'AINS situés dans la zone thérapeutique.

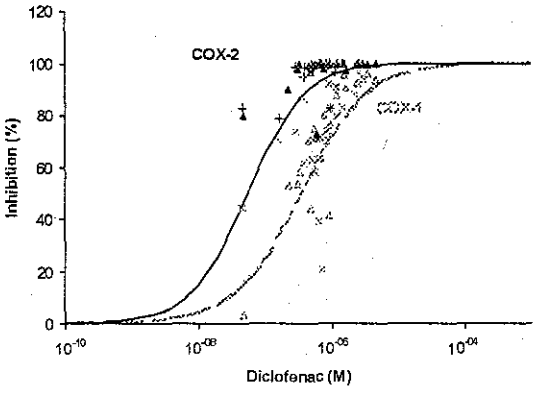
III.5.5. Valeur prédictive du système *in vitro* vis-à-vis des niveaux d'inhibition mesurés *ex vivo*:

→ Le pouvoir inhibiteur des AINS sur les iso-enzymes de COX, mesuré *ex vivo*, a été comparé au niveau d'inhibition attendu, c'est-à-dire mesuré d'après les concentrations circulantes d'AINS en utilisant les courbes dose-réponse obtenues *in vitro* (*cf* supra). Les concentrations d'AINS dans le sang total ont été transformées en concentrations plasmatiques en utilisant des facteurs de correction égaux à 1.65 ± 0.24 pour l'ibuprofène, 1.34 ± 0.20 pour le diclofénac et 1.49 ± 0.13 pour le méloxicam (cf. supra). L'analyse statistique a été réalisée selon le test de la valeur moyenne centrée en utilisant les intervalles [- 0.20 , + 0.20] ou [- 0.30 , + 0.30] comme seuil de significativité, comme cela est fait par exemple dans les études de bio-équivalence des médicaments. L'influence de la fixation protéique (étude du pouvoir prédictif des concentrations libres d'AINS) et de l'inversion chirale (étude du pouvoir prédictif de l'énantiomère S-(+)- de l'ibuprofène), a été étudiée pour tenter d'expliquer la variabilité inter-individuelle des pouvoirs inhibiteurs.

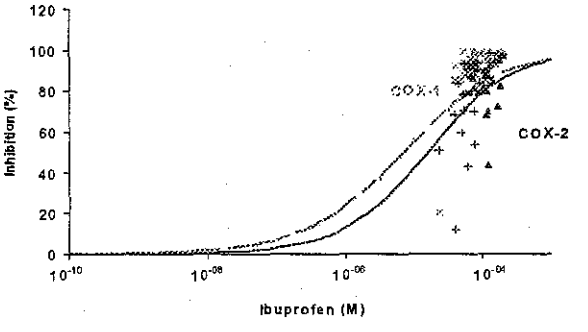
→ Lorsque l'on prend en considération les concentrations totales d'AINS, le système *in vitro* est prédictif des niveaux d'inhibition mesurés *ex vivo* pour le diclofénac (COX-1 et –2, prise unique ou répétée)(voir Figure 2a) et l'ibuprofène à l'exception de COX –2 après prise répétée de l'AINS (voir Figure 2b). Dans le cas du méloxicam,le système *in vitro* est prédictif du niveau d'inhibition mesuré *ex vivo* sur COX-2 mais jamais du niveau d'inhibition mesuré sur COX–1, que ce soit après prise unique ou répétée de l'AINS (voir Figure 2c).

Figure 2: Etude de la valeur prédictive des courbes dose-réponse des concentrations totales d'AINS établies *in vitro* vis-à-vis des niveaux d'inhibition des iso-enzymes de COX mesurés *ex vivo*. [*2a)* diclofénac ; *2b)* ibuprofène ; *2c)* méloxicam. Inhibition de COX-1 après prise unique △ ou répétée ✕ , inhibition de COX-2 après prise unique ▲ ou répétée ✢ de l'AINS].

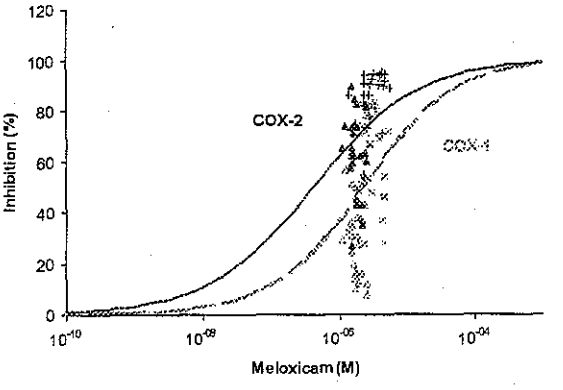
2a



2b

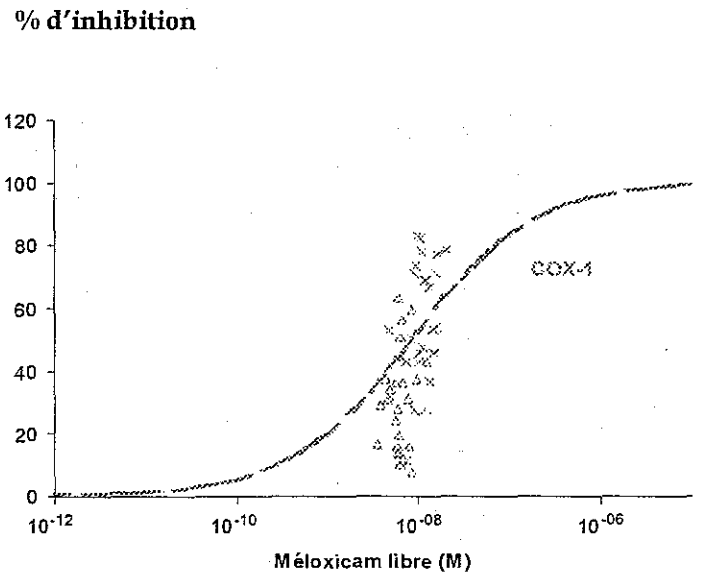


2c



→ La valeur prédictive du système *in vitro* n'est pas améliorée lorsque l'on prend en considération les concentrations libres d'AINS, que ce soit pour l'inhibition de COX–1 par le méloxicam [Figure 3a] ou l'inhibition de COX –2 par l'ibuprofène après prise répétée [Figure 3b].

3a



3b

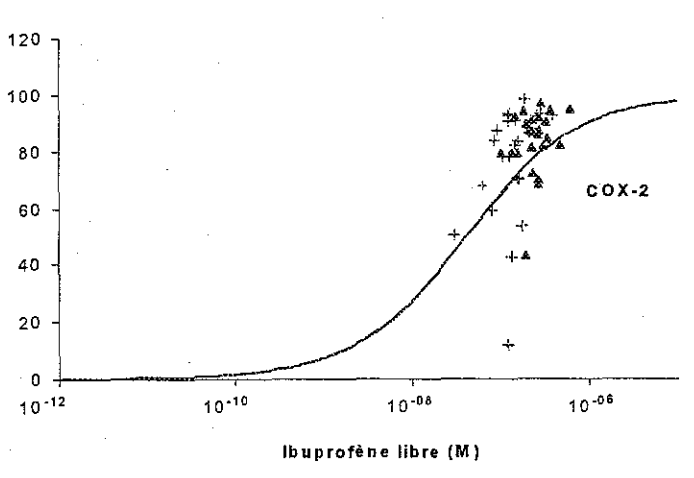


Figure 3: Etude de la valeur prédictive du système sang total en ne considérant le pouvoir inhibiteur sur les COXs que de la fraction libre des AINS.], .[*3a)* effet inhibiteur du méloxicam sur COX-1 après prise unique ▵ ou répétée × ; *3b)* effet inhibiteur de l'ibuprofène racémique sur COX-2 après prise unique ▲ ou répétée +].

→ La valeur prédictive du système *in vitro* n'est pas améliorée lorsque l'on prend en considération la concentration circulante de l'énantiomère *S*-(+)- de l'ibuprofène [Figure 4], énantiomère supportant la quasi totalité du pouvoir inhibiteur de l'ibuprofène racémique sur les COXs.

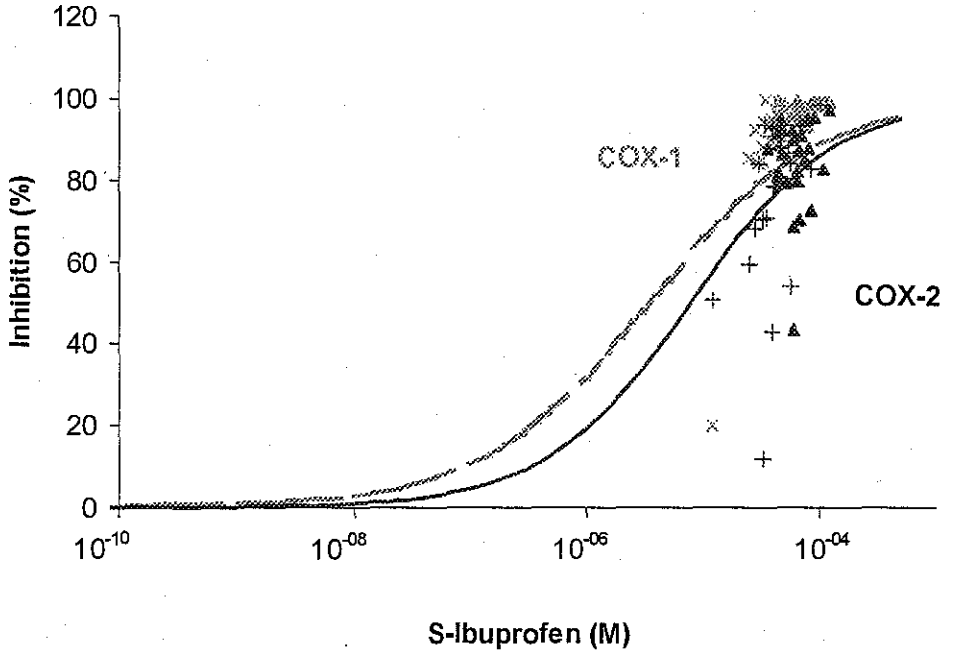


Figure 4: Etude de la valeur prédictive du système sang total en ne considérant que le pouvoir inhibiteur du S-ibuprofène sur les COXs: inhibition de COX-1 après prise unique △ ou répétée × ; inhibition de COX-2 après prise unique ▲ ou répétée +.

III.5.6. Mesure du pouvoir inhibiteur des AINS sur les eicosanoïdes urinaires

→ L'étude du pouvoir inhibiteur des AINS sur les prostaglandines urinaires (PGE_2; $PGF_{2\alpha}$) a été effectuée en comparant les taux de prostaglandines mesurés dans les urines de 24 h avant chaque séquence de traitement par un AINS (J-1 – J0) et ceux mesurés à la fin de chaque séquence (J final – J final+1). Les résultats ont été corrigés par la créatininurie, pour tenir

compte de la capacité d'excrétion urinaire et/ou vérifier la pertinence du volume urinaire recueilli.

→ L'effet des AINS sur la clairance de la créatinine a été étudié à partir du dosage de la créatininémie en utilisant la formule de Cockcroft et Gault: Cl (ml/mn) = [140 – âge] x poids (en kg) / créatininémie (en µmol/l) x 0.8. Conformément aux données de la littérature, aucun des traitements par AINS n'a réduit significativement la clairance de la créatinine (tableau 12).

DICLOFENAC		**IBUPROFENE**		**MÉLOXICAM**	
Avant traitement mL/min	**Après traitement** mL/min	**Avant traitement** mL/min	**Après traitement** mL/min	**Avant traitement** mL/min	**Après traitement** mL/min
100 ± 19	109 ± 20	102 ± 22	106 ± 19	104 ± 19	101 ± 21

Tableau 12: Evolution de la clairance de la créatinine chez les volontaires sains ayant reçu un traitement oral par ibuprofène (1200 mg pendant 2j) ou diclofénac (100 mg/j pendant 3j) ou méloxicam (7,5 mg/j pendant 5j)

→ Les taux urinaires corrigés de PGE_2 étaient de 11,7 ± 3,0 µg/g en moyenne et n'ont pas varié significativement entre les 3 séquences de traitement par AINS (13,1 ± 6,8 µg/g, 9,2 ± 3,6 µg/g, 12,8 ± 4,9 µg/g). De même, les taux urinaires corrigés de $PGF_{2\alpha}$ étaient de 10,9 ± 1,3 µg/g de créatinine en moyenne et n'ont pas varié significativement entre les 3 séquences de traitement par AINS (11,6 ± 2,8 µg/g, 9,5 ± 1,6 µg/g, 11,7 ± 2,2 µg/g).

→ L'excrétion urinaire de la prostaglandine F2α a été légèrement diminuée par les 3 AINS (- 34% après diclofénac ; - 25% après ibuprofène ; - 27% après méloxicam), sans atteindre toutefois le seuil de significativité statistique en raison de la grande dispersion des valeurs (Figure 5).

→ De même, l'excrétion urinaire de la prostaglandine E_2 a été légèrement diminuée par les 3 AINS (- 8% après diclofénac ; - 40% après ibuprofène ; - 25% après méloxicam), sans

atteindre toutefois le seuil de significativité en raison de la grande variabilité interindividuelle (Figure 5).

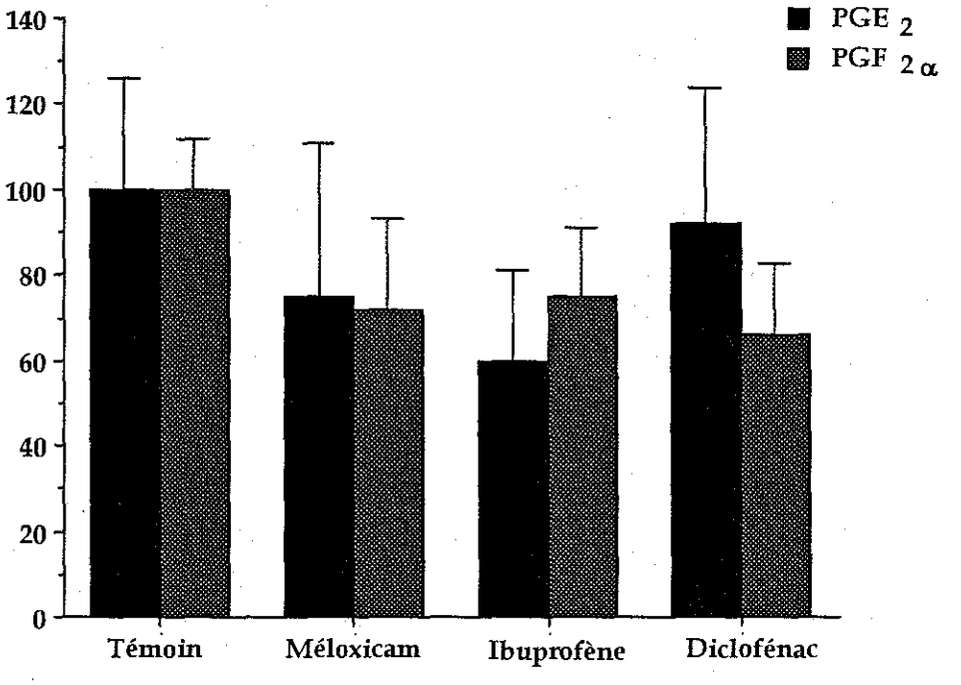


Figure 5: Variation de l'excrétion urinaire de prostaglandines sous l'effet d'un traitement par AINS. Les résultats sont exprimés en % de variation des taux urinaires mesurés dans les urines de 24 h, avant prise d'AINS

III.6. Discussion

Ce travail est original (et l'était encore plus lorsqu'il a été déposé auprès de l'Agence du Médicament en 1996) en ce sens qu'il prend en considération plusieurs facteurs déterminants pour l'appréciation de la sélectivité d'inhibition des COXs par les AINS:

- comparaison de molécules qui ont des profils de sélectivité très différents dans plusieurs systèmes d'étude *in vitro* (enzymes isolées, fractions microsomales, cellules transfectées, lignées cellulaires) ayant une faible pertinence physiopathologique,

- mesure des pouvoirs inhibiteurs *ex vivo* chez l'homme, après prise orale des AINS à posologie thérapeutique, en tenant compte des différences pharmacocinétiques entre les molécules (mesure après prise unique et répétée permettant de mettre en évidence une accumulation éventuelle des molécules),

- étude de la valeur prédictive du système sang total par la comparaison des niveaux d'inhibition observés *ex vivo* avec ceux attendus d'après l'extrapolation des courbes dose-réponse à partir des concentrations circulantes d'AINS.

Il faut d'ailleurs souligner que l'évolution de la notion de "sélectivité" des AINS pour les iso-enzymes de COX, prenant désormais en compte des données biochimiques (études sur enzymes isolées ou cellules transfectées), pharmacologiques (études sur les modèles animaux) et cliniques, est venue confirmer l'intérêt de notre étude. De même, de nombreux articles scientifiques ont conduit, au cours des 2 dernières années, à un consensus international considérant que le système sur sang total est le meilleur système biologique pour établir la sélectivité des AINS [37, 135, 254], ce qui conforte la légitimité de cette étude. D'autre part, l'intérêt clinique (extrapolation de l'efficacité anti-inflammatoire et de la toxicité digestive) des courbes *in vitro* obtenues sur sang total a été suggéré par plusieurs études qui ont rapporté un lien plus ou moins étroit entre les ratios de sélectivité des COXs et leur capacité à produire des complications digestives (37, 254, 121, 248). En outre, cette hypothèse a été confirmée par la faible incidence des évènements indésirables digestifs graves avec les inhibiteurs sélectifs de COX-2 [14, 218]. Si, comme les autres systèmes *in vitro*, la méthode sur sang total est limitée par le fait que le niveau d'inhibition n'est pas mesuré dans les tissus cibles que sont l'articulation inflammatoire et la muqueuse gastrique, cette méthode présente l'avantage de pouvoir évaluer la sélectivité *ex vivo* à des niveaux thérapeutiques d'AINS [175, 176].

Dans un premier temps, nous avons montré que les courbes dose-réponse, établies *in vitro* sur sang total, permettent de distinguer les 3 AINS et que:

- l'ibuprofène inhibe plus efficacement COX-1 que COX-2 (ratio à 2,33), ce qui est compatible avec son « statut » d'inhibiteur réputé non sélectif de COX dans des études précédentes [179, 180],

- le diclofénac inhibe plus efficacement COX-2 que COX-1, ce qui est légèrement différent de son « statut » d'inhibiteur réputé « équilibré » de COX [180],

- le méloxicam inhibe plus efficacement COX-2 que COX-1, ce qui est compatible avec son « statut » d'inhibiteur réputé « préférentiel » de COX-2. [176, 179, 180].

Il faut cependant souligner que, dans nos conditions expérimentales, le diclofénac est un inhibiteur de COX plus puissant que le méloxicam (6 à 10 fois selon l'iso-enzyme considérée) et qu'il a un profil de sélectivité pour COX-2 supérieur à celui du méloxicam. Ceci a été confirmé depuis par d'autres travaux utilisant le système sang total [176, 179, 180], le méloxicam devenant plus sélectif de COX-2 que le diclofénac dans un système modifié dans lequel le temps d'incubation avec les 2 iso-enzymes est identique [254].

Les études utilisant des concentrations de LPS plus élevées (100µg/ml pour augmenter l'induction de COX-2) [17, 37, 173] ont obtenu des niveau de base de PGE_2 plus élevés, mais des IC_{50} comparables aux IC_{50} de notre étude. De manière intéressante, les IC_{50} obtenues dans des études utilisant une méthode *in vitro* sang total modifiée sont proches des IC_{50} que nous obtenons, suggérant que la méthode *in vitro* sur sang totale est une méthode assez reproductible. Ces méthodes visant à obtenir des temps d'incubation identiques des COXs avec les AINS (stimulation de COX-2 par le LPS et de COX-1 par l'ionophore calcique A23187 pendant 5 h [80]), soit à mesurer la production d'un même eicosanoïde par les 2 isoenzymes des COX [266], ne semblent pas cependant optimales. En effet, la stimulation de COX-1 par le A23187 est moins physiologique que la coagulation spontanée et une stimulation des

leucocytes pendant 5 h ne procure pas un niveau suffisant d'induction de COX-2 [181]. D'autre part, la production de TXB_2 est un reflet moins fidèle de l'activité COX-2 leucocytaire que celle de PGE_2 [19]. De même, les modifications apportées par Grossman et collaborateurs [87], puis par Laufler et collaborateurs [130], ont permis de rendre la méthode plus rapide mais moins physiologique (utilisation de ionophore calcique) et plus contraignantes (nombreuses manipulations).

On peut donc conclure que, sur les données obtenues *in vitro* à partir des IC_{50}, le diclofénac est un inhibiteur aussi sélectif de COX-2 que le méloxicam. Cette notion est d'ailleurs confortée par le fait que le niveau théorique d'inhibition de COX-1 *in vitro* serait de 30 % pour le diclofénac et 51% pour le méloxicam lorsque COX-2 est inhibée de 80 %, valeur considérée comme nécessaire à l'obtention d'un effet anti-inflammatoire.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que les niveaux d'inhibition des COXs mesurés *ex vivo* sur sang total, permettent de distinguer les 3 AINS et que:

- l'ibuprofène inhibe plus efficacement COX-1 que COX-2, dès la première prise de médicament,
- le diclofénac inhibe plus efficacement COX-2 que COX-1, dès la première prise de médicament,
- le méloxicam inhibe plus efficacement COX-2 que COX-1, avec une augmentation progressive du pouvoir inhibiteur avec la répétition des prises médicamenteuses.

Il semble important de rappeler que, dans cette étude, l'évolution des pouvoirs inhibiteurs sur les COXs a suivi celle des concentrations circulantes d'AINS (taux similaires après prise unique et à l'état d'équilibre pour le diclofénac et l'ibuprofène, augmentation de 1.8 fois des taux de méloxicam à l'état d'équilibre), ce qui confirme que l'interprétation des niveaux d'inhibition des COXs *ex vivo* doit impérativement tenir compte des caractéristiques pharmacocinétiques des médicaments. Ainsi, le pouvoir inhibiteur sur COX-1 doit être mesuré

au T*max* (temps que nous approchons dans notre étude) du médicament, ce qui a été démontré lors des études du pouvoir anti-agrégant plaquettaire des AINS [196]. Les différences entre les moments auxquels les prélèvements sanguins ont été effectués après la prise orale d'AINS (2 h [49] ou 3 heures [231] pour le méloxicam par exemple) pourraient d'ailleurs être à l'origine de résultats contradictoires dans la littérature.

De même, nos résultats montrent que, pour un AINS à demi vie longue (méloxicam dans cette étude), il est primordial de mesurer les niveaux d'inhibition après prise répétée du médicament (état d'équilibre) et, de préférence, après la dernière prise du médicament plutôt qu'en activité résiduelle.

Les résultats obtenus *ex vivo* montrent également les limites d'interprétation des indices de sélectivité calculés *in vitro* puisque: *a)* l'ibuprofène inhibe très efficacement COX-2 *in vivo*, ce qui contribue très largement à ses propriétés anti-inflammatoires ; *b)* l'inhibition modérée de COX-1 par le méloxicam est associée à une inhibition plus modeste de COX-2 qu'avec les autres AINS, ce qui pose le problème de la contribution de l'inhibition de cette iso-enzyme dans les effets thérapeutiques observés dès la posologie quotidienne de 7.5 mg ; *c)* le diclofénac perd la sélectivité pour COX-2 observée *in vitro*, puisqu'il inhibe l'activité COX-1 d'environ 70 % dès la première prise médicamenteuse. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons donc observé une « préservation » de l'activité COX-1 qu'avec le méloxicam, et cet effet s'accompagnait d'une inhibition modérée de COX-2 et était moins marqué à l'état d'équilibre qu'après prise unique du médicament. Ces résultats sont cohérents avec la classification du méloxicam comme « inhibiteur préférentiel de COX-2 », en ce sens qu'il n'inhibe pas fortement COX-1 à la plus faible posologie (7.5 mg/j) mais qu'il provoquera, sans aucun doute, une inhibition importante de cette iso-enzyme à une posologie supérieure (15 mg/j). Nos résultats contrastent avec ceux de Stichtenoth qui ont rapporté une préservation complète de la production de TXB2 avec 7,5 mg/jour de méloxicam [231]. En dehors du fait

que le moment de la mesure de l'inhibition des COXs est différent (non au pic de concentration), ces différences pourraient être liées au fait que dans cette étude, la production de TXB_2 est mesurée après stimulation ave 1 µM d'acide arachidonique au lieu d'être mesurée après coagulation spontanée. Or, non seulement l'acide arachidonique exogène influence fortement l'activité de COX-1 [199], mais l'agrégation plaquettaire n'est pas modifiée pour une inhibition de TXB_2 égale à 66% durant la coagulation spontanée [49]. Ces résultats montrant une dissociation entre la production de TXB_2 et l'agrégation plaquettaire (il faut en effet une inhibition au moins égale à 95% de TXB2 pour obtenir une inhibition de l'agrégation plaquettaire) [196] suggèrent que le choix de la méthodologie pour évaluer l'inhibition de COX-1 est importante. En effet, si une inhibition de 55% de COX-1 avec le méloxicam peut être considérée comme épargnant la synthèse de TXB_2 *in vivo*, elle ne garantit pas une effet protecteur de COX-1 au niveau gastrique, puisque les concentrations locales (gastriques) d'AINS après prise orale peuvent excéder largement les concentrations plasmatiques.

Ces résultats d'inhibition des iso-enzymes sanguines de la COX par les AINS *ex vivo* doivent également être interprétés en considérant que les niveaux d'inhibition tissulaires susceptibles d'être rencontrés dans l'organisme peuvent être beaucoup plus importants, en raison des plus grandes concentrations locales d'AINS (muqueuse digestive par exemple). Ceci illustre les limites latentes de la définition de la sélectivité d'inhibition des COXs par les AINS chez l'Homme puisque: *a)* aucune donnée comparant les niveaux d'inhibition dans les tissus cibles (tissus synovial inflammatoire, muqueuse gastrique par exemple) n'a été rapportée à ce jour ; *b)* certaines études animales suggèrent que les propriétés pharmacologiques des AINS ne relèvent pas exclusivement de l'inhibition des COXs, ce qui est compatible avec nos résultats sur le méloxicam et le diclofénac (équivalence d'efficacité clinique entre 7,5 mg de méloxicam et 100 mg de diclofénac (Hosie-1996 ; Distel-1996) alors que le diclofénac inhibe plus efficacement les COXs que le méloxicam 7,5 mg dès la posologie quotidienne de 75 mg).

L'étude du pouvoir inhibiteur des AINS sur l'excrétion urinaire des prostaglandines E2 et F2α, qui peuvent être considérés comme le reflet de la synthèse rénale des prostaglandines [32, 231] a permis de montrer que:

- les taux urinaires de PG sont très variables chez l'homme, ce qui résulte peut-être d'une contamination par les prostaglandines d'origine séminale [67, 183, 214]. Cependant, PGE_2 et $PGF_{2\alpha}$ sont revenues à leur niveau de départ avant chaque prise d'AINS, suggérant que leur réduction par les AINS est une bonne estimation de l'inhibition des COXs rénales,
- les 3 AINS n'ont pas modifié la clairance de la créatinine, confirmant que les PG ne jouent qu'un faible rôle dans l'homéostasie rénale des sujets sains [174]. Cependant, les AINS ont inhibé modérément les prostaglandines urinaires, aux posologies administrées (moitié de la posologie maximale recommandée), avec un effet plus marqué sur $PGF_{2\alpha}$ que sur PGE_2. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui ont montré que le méloxicam ne réduisait pas significativement PGE_2 urinaire chez les volontaires sains [230, 231] ou chez les sujets ayant une insuffisance rénale modérée [11],
- il n'y a pas de lien apparent entre le pouvoir inhibiteur des AINS sur les prostaglandines urinaires et sur les iso-enzymes sanguines de COX, ce qui reflète probablement une inhibition de pools différents de prostaglandines (reins pour les métabolites urinaires) mais souligne les limites d'interprétation de l'inhibition des COXs sanguines par rapport aux niveaux d'inhibition tissulaires (muqueuse digestive après prise orale par exemple). Ces résultats suggèrent que la mesure des iso-enzymes circulatoires des COXs fournit une évaluation plus fine de la sélectivité des AINS, ce qui est corroboré par le fait qu'une inhibition presque complète de la synthèse de TXB_2 est nécessaire pour produire une réduction significative de l'excrétion urinaire de 2-3-dinor-TXB_2 [196].

Ces résultats montrent également qu'il n'existe pas de lien apparent entre la sélectivité d'inhibition des iso-enzymes sanguines de la COX par les AINS et leur effet inhibiteur sur

l'élimination urinaire des prostaglandines, ce qui confirme que ces métabolites sont principalement le reflet de l'inhibition tissulaire (rénale) de la biosynthèse des eicosanoïdes à la différence de la PGE-M ou du 2.3-dinor-TXB_2.

Enfin, l'étude de la valeur prédictive du système sang total a permis de montrer que:

- les courbes dose-réponse effectuées *in vitro* ont une bonne valeur prédictive pour le pouvoir inhibiteur du diclofénac *ex vivo*, une valeur prédictive faible pour le pouvoir inhibiteur de l'ibuprofène sur COX-2 à l'état d'équilibre, et n'ont aucune valeur prédictive pour le pouvoir inhibiteur du méloxicam sur COX-1,

- les 3 AINS ne se répartissent pas uniformément entre les compartiments plasmatiques et cellulaires sanguins, ce qui démontre que la transformation des concentrations sanguines en concentrations plasmatiques ne peut pas être faite simplement en considérant que les AINS sont confinés dans l'espace extracellulaire et donc en ne considérant que l'hématocrite [172,180]. Les différents facteurs de conversion des concentrations sanguines en concentrations plasmatiques, calculés pour les 3 AINS testés, ne sont pas dus à leur différence de caractère acide (ces 3 molécules étant des acides carboxyliques ou énoliques), mais probablement à des différences de liposolubilité. Bien que les facteurs de correction soient peu différents dans notre étude, expliquant qu'ils n'aient influencé que légèrement les résultats, il est probable que la prise en considération de la capacité de partition de l'AINS entre globule rouge et plasma ou sérum serait plus cruciale pour l'étude de molécules non acides comme le célécoxib [42]. De plus, l'utilisation de l'hématocrite pour convertir les courbes d'inhibition obtenues *in vitro* sur sang total en courbes sériques, au lieu de celles du facteur de correction exact, serait plus hasardeuse en condition inflammatoire, où l'hématocrite est modifié (présence d'une anémie en cas d'inflammation subaiguë ou chronique).

- dans le cas de l'ibuprofène, la valeur prédictive des courbes dose-réponse n'est pas améliorée lorsque l'on prend en considération l'énantiomère *S*-(+), qui est le principal support de

l'inhibition des COXs d'après les études *in vitro* [15], et qui peut être produit par l'inversion énantiomérique *in vivo via* la formation de CoA thio-esters [63]. Nous avons observé que le rapport *S*-(+)/ *R*-(-) est très variable à un temps donné et augmente avec la répétition des prises d'ibuprofène chez un même sujet. De plus, la plus faible prédiction des résultats *ex vivo* par les courbes *in vitro* a été observée à l'équilibre, quand le rapport *S*-(+)/ *R*-(-) est le plus élevé. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de COX-2 à un niveau plus élevé que celui attendu pourrait être lié à l'effet inhibiteur du *S*-(-)-ibuprofénoyl-CoA mais également du *R*-(-)-ibuprofénoyl-CoA thio-ester sur COX-2 [164].

L'un des points forts de la méthode sur sang total est qu'elle respecte la liaison des AINS aux protéines tant *in vitro* qu'*ex vivo* [173, 180]. Comme cette fixation protéique est très élevée, et concerne majoritairement l'albumine, nous avons cherché si une variabilité interindividuelle dans la liaison aux protéines plasmatiques permettait d'expliquer la faible prédictibilité des résultats *ex vivo* par les courbes *in vitro*. La valeur prédictive des courbes dose-réponse n'est cependant pas améliorée lorsque l'on prend en considération la fraction libre des médicaments. Ceci n'est pas surprenant chez des volontaires sains, pour lesquels les concentrations libres d'AINS sont le reflet fidèle des concentrations totales, d'autant que les AINS testés ont une fixation protéique linéaire [50]. Cependant, la prise en considération de la concentration libre d'AINS est intéressante, car elle est la seule à permettre d'appliquer cette approche à des situations pathologiques au cours desquelles il existe une hypo-albuminémie, comme les maladies inflammatoires chroniques. Pour l'ibuprofène, la mesure des concentration libres était d'autant plus intéressante que la fixation protéique peut être tantôt linéaire, tantôt non linéaire selon la concentration totale d'ibuprofène et ce, d'autant qu'il existe une compétition de fixation à l'albumine entre les énantiomères *S*-(+) et *R*-(-) [43]. Nous avons observé que la proportion du *S*-(+)-ibuprofène libre, l'énantiomère qui se fixe le moins fortement à l'albumine [76], augmentait avec le temps (72% après prise unique et 81% après prise répétée). Cette

observation est en accord avec l'augmentation du rapport *S*-(+)/*R*-(-) entre la prise unique ou répétée, suggérant que cette augmentation de la fraction libre *S*-(+)/*R*-(-) est liée à l'inversion chirale plutôt qu'à la liaison protéique différentielle des 2 énantiomères. Cependant, bien que nous ayons observé une augmentation de la fraction libre pharmacologiquement active, le système *in vitro* sous-estime le pouvoir inhibiteur de l'ibuprofène sur COX-2 à l'équilibre, suggèrant une contribution d'autres métabolites dans l'inhibition de COX-2 *ex vivo*.

Il est important de souligner que le faible niveau de prédiction de la méthode *in vitro* vis-à-vis des conditions *ex vivo* n'est pas lié à nos conditions expérimentales. En effet, cette étude a été réalisée dans des conditions optimales en termes de mesure du pouvoir inhibiteur sur les COXs [grand nombre de patients (n = 24) alors que la moyenne est d'environ 11 patients dans la plupart des études publiées [32, 37, 38, 49, 173, 176, 238]; volontaires sains de même sexe et appartenant à une tranche d'âge homogène chez lesquels les variations pharmacocinétiques sont *a priori* minimisées), ce qui montre l'impossibilité d'extrapoler les résultats à des situations physiopathologiques complexes (sujets âgés, polymédicamentation, inflammation chronique, insuffisance rénale, etc...). Le nombre important de sujets dans cette étude a été rendu nécessaire par la confirmation d'une grande variabilité intra-individuelle des concentrations de base de TXB_2 (COX-1) (26 ± 18 %) et de PGE_2 (COX-2) (18 ± 13 %), ce qui est en accord avec les données de la littérature (12 ± 3 % [32], 20 à 30 % [180, 181, 238] ; 16 ± 9 % [176] ; 14 ± 5 % [182]). Cette variabilité atteint même 39 % pour COX-1 et 36% pour COX-2. De plus, la variabilité inter-individuelle est particulièrement marquée pour l'inhibition de COX-1 après prise de méloxicam, avec des cœfficients de variation de 53% après prise unique et de 36% après prise répétée. Cette variabilité a dépassé toutes nos prévisions et contraste avec la grande homogénéité de l'inhibition de COX-2 mesurée *ex vivo* et celle des taux plasmatiques de méloxicam.

De manière étonnante, l'augmentation des concentrations plasmatiques de méloxicam entre le pic et le pic-équilibre est proportionnelle à l'augmentation du niveau d'inhibition de COX-1 (1,8 fois) [50] alors que ce n'est pas le cas pour le pouvoir inhibiteur de COX-2 (1,3 fois). Une dissociation similaire a été rapportée entre les taux circulants de méloxicam et son pouvoir inhibiteur sur les COXs, après ingestion de doses croissantes de méloxicam, bien que ce phénomène ait été observé de la même manière pour COX-1 et COX-2 [176]. Les auteurs faisaient l'hypothèse que cette augmentation progressive de l'inhibition de COX-1 était liée à un phénomène d'inhibition cumulative de l'activité plaquettaire. Au contraire, une adaptation de la COX-1 plaquettaire était proposée par d'autres auteurs ayant observé une inhibition de COX-1 qui était moins importante après prise répétée de méloxicam que ce qu'ils avaient projeté à partir d'une prise unique du médicament [238]. Nos résultats, montrant que le niveau d'inhibition de COX-1 suit le niveau de la concentration plasmatique entre pic et pic-équilibre, ne confortent aucune de ces deux hypothèses. Ils suggèrent plutôt que l'incapacité des courbes *in vitro* à prédire le niveau mesuré d'inhibition mesuré *ex vivo* pour le méloxicam est attribuable à l'absence d'inhibition de COX-1 observée chez certains sujets malgré des concentrations plasmatiques dans la fourchette thérapeutique. Bien que restant inexpliquée, cette grande variabilité individuelle explique en partie l'éclatement des valeurs d'inhibition observé *ex vivo*, ce qui correspond d'ailleurs à des concentrations plasmatiques se situant dans la partie linéaire des courbes dose-réponse, c'est à dire dans la zone où une faible variation de concentration s'accompagne d'une différence significative de l'inhibition des COXs. L'influence variable des concentrations plasmatiques du méloxicam sur l'inhibition de COX-1 et de COX-2 pourrait donc refléter une accumulation du méloxicam dans les monocytes. L'existence de mécanismes d'inhibition différents de COX-1 et COX-2 par le méloxicam pourrait être une autre explication, à savoir une inhibition rapide et réversible de COX-1 et une inhibition d'interaction lente de COX-2 [76].

Notre étude réalisée sur un grand nombre de sujets, montre que les moyennes des IC_{50} individuelles sont très proches des IC_{50} calculées à partir de la courbe moyenne d'inhibition des COXs, ce qui valide cette dernière. Ainsi, bien que les niveaux d'activité de base pour COX-1 et pour COX-2 soient plus variables pour la méthode sur sang total *in vitro* que dans d'autres systèmes cellulaires ou sur enzymes purifiées [147, 173], nos résultats montrent que cette variabilité n'est pas une limite à la validité des IC_{50} obtenues pour COX-1 et pour COX-2 [134], à condition qu'un nombre suffisant de sujets ait été inclus dans l'étude.

Enfin, la faible valeur prédictive des résultats obtenus *in vitro* vis-à-vis des conditions de prescription *(ex vivo)* pourrait relever de différences d'accumulation des AINS dans les cellules cibles, d'une variabilité de biotransformation entre les individus ou de la contribution de métabolites, non formés *in vitro,* dans le pouvoir inhibiteur mesuré *ex vivo* [173, 180]. Nous avons démontré que le diclofénac possède une plus grande sélectivité pour COX-2 que le méloxicam *in vitro,* alors qu'il inhibe davantage COX-1 que le méloxicam après prise unique ou répétée. Contrairement au nimésulide, dont le niveau de sélectivité pour COX-2 est surestimé par les courbes *in vitro* [179] par rapport aux résultats *ex vivo* [38, 175], en raison de sa transformation en un métabolite actif non sélectif (4-hydroxynimésulide) [44], les discordances entre nos résultats *in vitro* et ex *vivo* ne peuvent pas être attribuées à un métabolisme hépatique plus lent du méloxicam que du diclofénac, puisque leurs métabolites sont tous inactifs [41, 50]. Comme le méloxicam 7.5 mg /jour est aussi efficace que de plus fortes posologies de diclofénac dans les études cliniques [50], ce résultat pose la question de la contribution d'autres mécanismes que l'inhibition des COXs dans les effets thérapeutiques de certains AINS.

III.7. Conclusions et perspectives

En conclusion, nos résultats montrent la faible pertinence de l'extrapolation des pouvoirs inhibiteurs sur les COXs *ex vivo* à partir des concentrations circulantes d'AINS et des courbes dose-réponse établies *in vitro*. Par conséquent, la seule évaluation de l'inhibition des COXs qui soit pertinente chez l'Homme, en tenant compte des limites d'interprétation dues aux différences de concentrations en AINS entre les compartiments plasmatique et tissulaires, est la mesure effectuée *ex vivo* à des temps permettant l'absorption totale des médicaments.

Les seuls regrets que l'on peut formuler à propos de cette étude, mais qui ne remettent pas en cause l'interprétation de l'analyse du système sur sang total, sont que la démonstration aurait été encore plus probante en incluant des patients ayant ingéré différentes posologies pour chaque AINS. En effet, nous ne pouvons éliminer que le caractère peu prédictif de la méthode *in vitro* vis-à-vis des conditions *ex vivo* n'ait pas été influencé par la posologie intermédiaire utilisée pour l'ibuprofène et le diclofénac. En effet, parce que le niveau d'inhibition des AINS est proportionnel à leurs posologies [176, 238], et que l'évaluation des AINS à la moitié de la posologie maximale recommandée s'accompagne déjà d'une inhibition presque complète de COX-1 par l'ibuprofène et de COX-2 par le diclofénac dès la première prise, l'étude de posologies plus faibles aurait été pertinente. Ce résultat inattendu a été favorisé par le choix du moment de prélèvement sanguin (au voisinage du pic, c'est à dire au moment où la concentration est la plus élevée) puisque le niveau d'inhibition suit la pharmacocinétique des AINS [176, 238]. Cependant, l'étude de posologies moindres aurait considérablement allongé et compliqué le protocole en raison du nombre de bras nécessaire. De plus, l'objectif de notre étude était justement d'évaluer le caractère prédictif de la méthode *in vitro* aux conditions *ex vivo* vis-à-vis de posologies réellement utilisées en clinique et équivalentes en terme d'efficacité clinique. Cependant, le manque de prédiction est surtout vrai pour le méloxicam, dont les

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

posologies inférieures à 7,5 mg sont inefficaces [50] et dont la posologie de 7,5 mg/j est aussi efficace que 100 mg/j de diclofénac dans l'arthrose, et non 75 mg comme étudiés dans notre étude. Dès lors, nous pouvons considérer que nous avons étudié les plus faibles posologies efficaces d'AINS. De plus, comme les concentrations plasmatiques des AINS étaient nettement supérieures à leurs IC_{50} pour COX-2 (28 à 40 fois sur le diclofénac, 8 à 14 fois sur le méloxicam et 12 à 19 fois sur l'ibuprofène), on peut considérer qu'aux posologie faibles étudiées, les AINS avaient une efficacité anti-inflammatoire comparable. Il est donc possible de conclure que si les mesures *in vitro* sont très utiles pour « screener » les molécules susceptibles d'être sélectivement inhibitrices de COX-2, la mesure des pouvoirs inhibiteurs *ex vivo* se révèle indispensable pour évaluer réellement leur profil de sélectivité pharmacologique. Bien évidemment, il aurait été intéressant de compléter nos résultats en incluant des inhibiteurs « réputés sélectifs de COX-2 » comme le célécoxib ou le rofécoxib (molécules non autorisées en France à l'époque) ou d'autres inhibiteurs sélectifs de COX-2 en cours d'enregistrement auprès de la FDA tels que le valdécoxib [236] ou l'étoricoxib [200], qui sont encore plus sélectifs de COX-2 que les précédents. Cependant, puisque la méthode *in vitro* sur sang total a montré ses limites dans nos conditions d'étude, on peut considérer légitimement que ces limites sont applicables aux autres AINS et aux autres conditions méthodologiques (autres posologies et autres moment de prélèvement). Par conséquent, la mesure des cinétiques d'inhibition des COXs *ex vivo* semble la seule méthodologie adaptée et elle peut être utilisée au cours de pathologies inflammatoires, sous réserve que l'on prenne en considération les variations de fixation protéique.

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

III. BIBLIOGRAPHIE

1. Acevedo E, Castaneda O, Ugaz M, Beaulieu AD, Pons-Estel B, et al.
Tolerability profiles of rofecoxib (Vioxx) and Arthrotec. A comparison of six weeks treatment in patients with osteoarthritis.
Scand J Rheumatol 2001;30(1):19–24
2. Agrawal NM, Caldwell J, Kivitz AJ, Weaver AL, Bocanegra TS, Ball J, Dhadda S, Hurley S, Hancock L.
Comparison of the upper gastrointestinal safety of Arthrotec 75 and nabumetone in osteoarthritis patients at high risk for developing nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal ulcers.
Clin Ther 1999 Apr;21(4):659–74.
3. Agrawal NGB, Porras AG, Matthews CZ, Woolf EJ, Miller JL, Mukhopadhyay S, et al.
Dose proportionality of oral etoricoxib, a hignly selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in healthy volunteers.
J Clin Pharmacol 2001;41:1106–1110.
4. Alshafie GA, Abou-Issa HM, Seibert K, et al.
Chemotherapeutic evaluation of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a rat mammary tumour model.
Oncol Rep 2000;7:1377–81.
5. Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshalll PJ, Rediske J, Stuchin SA, Patel IR, Abramson SB.
Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage:influence of nitric oxide.
J Clin Invest 1997;99:1231–7.
6. Arvind P, Qiao L, Papavassiliou ED, Goldin E, Koutsos M, Rigas B.
Aspirin and aspirin-like drugs induce the expression of HLA-DR in HT29 colon adenocarcinoma cells.
Int J Oncol 1996;8:1207–11.
7. Bagheri H, Lhiaubet V, Montastruc JL et al.
Photosensitivity to ketoprofen. Mechanisms and pharmacoepidemiological data.
Drug Safety 2000;22:339–49.
8. Bensen WG, Fiechtner JJ, McMillen JI, et al.
Treatment of osteoarthritis with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor:a randomized controlled trial.
Mayo Clin Proc 1999;74:1095–1105.
9. Bertin P et al.
Sodium naproxen:concentration and effect on inflammatory response mediators in human rheumatoid synovial fluid.
Eur J Clin Pharmacol 1994;46:3–7.
10. Bertin P.
Inhibiteurs spécifiques de la COX-2:une révolution dans les anti-inflammatoires ?
Revue du Praticien 2000;14:69–72.
11. Bevis PJR, Bird HA, Lapham G.
An open study to assess the safety and tolerability of meloxicam 15 mg in subjects with rheumatic disease and mild renal impairment.
Br J Rheumatol 1996;35(1 Suppl):56–60.
12. Bidgood MJ, Jamal OS, Cunningham AM, Brooks PM, Scott KF.
Type IIA secretory plospholipase A2 up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin prodution in human rheumatoid synoviocytes.
J Immunol 2000;165:2790–2797.

13. Blain B, JY Jouzeau, A Blain, P Tréchot, J Touchon, P Netter, C Jeandel.
Maladie d'Alzheimer et anti-inflammatoires non stéroïdiens sélectifs de COX-2. Justification et perspectives.
Presse Méd. 2000;29:267-73.
14. 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;343:1520-1528.
15. Boneberg EM, Zou M-H, Ullrich V.
Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by R(-) and S(+)-ibuprofen.
J Clin Pharmacol 1996;36:16S-9S.
16. Brash AR.
Arachidonic acid as a bioactive molecule.
J Clin Invest 2001;107:1339-45.
17. Brideau C et al.
A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors.
Inflamm Res 1996;45:68-74.
18. Brochier ML, for the Flurbiprofen French Trial.
Evaluation of flurbiprofen for prevention of reinfarction and reocclusion after successful thrombolysis or angioplasty in acute myocardila infarction.
Eur Heart J 1993;14:951-957
19. Brock TG, McNish RW, Peters-Golden M.
Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2.
J Biol Chem 1999;274:11660-66
20. Caggiano AO, Kraig RP.
Eicosanoids and nitric oxide influence induction of reactive gliosis from spreading depression in microglia but not astrocytess.
J Comp Neurol 1996; 369:93-108.
21. Cannon GW, Caldwell JR, Holt P, et al.
Rofecoxib, a specific inhibitor of cyclooxygenase 2, with clinical efficacy comparable with that of diclofenac sodium:results of a one-year, randomized, clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee and hip.
Arthritis Rheum 2000;43:978-987.
22. Cataldo G, Heiman F, Lavezzari M, Marubini E.
Indobufen compared with aspirin and dipyridamole on graft patency after coronary artery bypass surgery:results of a combined analysis.
Coron Artery Dis 1998;9:217-222.
23. Catella-Lawson F et al.
Ibuprofen, but not celecoxib or acetaminophen, antagonizes the irreversible anti-platelet effect of aspirin [abstract].
Arthritis Rheum 2000;43:S298.
24. Catella-Lawson F, et al.
Non-steroidal anti-inflammatory drugs antagonize the irreversible anti-platelet effect of aspirine.
Suppl Br J Clin Pharmacol. P.26, no.95.
25. Catella-lawson F, McAdam B, Morrison BW, et al.
Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids.
J Pharmacol Exp Ther 1999;289:735-41.

26. 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;16:107–22.
27. Cheer SM, Goa KL.
Parecoxib (parecoxib sodium).
Drugs 2001;61:1133–41.
28. Chen J, Marsh T, Zhang JS et al.
Expression of cyclooxygenase 2 in rat brain following kainate treatment.
Neuroreport 1995; 6:245–8.
29. Chen J, Weinstein PR, Graham SH.
Attenuation of postischemic brain hypoperfusion and reperfusion injury by the cyclooxygenase–lipoxygenase inhibitor BW755C.
J Neurosurgery 1995; 83:99–104.
30. Chulada PC.
Genetic disruption of Ptgs–1, as well as Ptgs–2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice.
Cancer Res 2000;60:4705–8.
31. Churchill L et al.
Selective inhibition of human cyclo–oxygenase–2 by meloxicam. Inflammopharmacology 1996;4:125–35.
32. Cipollone F, Ganci A, Panara MR, Greco A, Cucurullo F, Patrono C, et al.
Effects of nabumetone on prostanoid biosynthesis in humans.
Clin Pharmacol Ther 1995;58:335–41.
33. Clemett D, Goa KL.
Celecoxib: a review of its use in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acute pain.
Drugs 2000;59:957–980.
34. Cole DJ, Patel PM, Schell RM, Drummond JC, Osborne TN.
Brain eicosanoid levels during temporary focal cerebral ischemia in rats: a microdialysis study.
J Neurosurg Anesthesiol 1993;5:41–47.
35. Collins R, Peto R, MacMahon S, et al.
Blood pressure, stroke, and coronary heart disease, II:short–term reductions in blood pressure:overview of randomized drug trials in their epidemiological context.
Lancet 1990;335:827–38.
36. Copeland R.A. et al.
Mechanisms of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase.
Proc Natl Acad Sci. USA 1994; 91:11202–11206.
37. Cryer B, Feldman M.
Cyclooxygenase–1 and cyclooxygenase–2 selectivity of widely used nonsteroidal anti–inflammatory drugs.
Am J Med 1998;104:413–421.
38. Cullen L, Kelly L, O. Connor S, Fitzgerald DJ.
Selective cyclooxygenase–2 inhibition by nimesulide in man.
J Pharmacol Exp Ther 1998;287:578–82.
39. Dallob A, Depré M, De Lepeleire I, Agrawal N, Musser B, et al.
MK–0663 a highly selective inhibitor of COX–2 in humans.
Ann Rheum Dis 2000;59(suppl 1):331.
40. Daniels SE, Kuss M, Mehlish DR, Bauman A, Baum D, Karim A, Hubbard R.
Pharmacokinetic and efficacy evaluation of intravenous parecoxib in a postsurgical dental pain model.
Clin Pharmacol Ther 2000;67(2):Abst PI–8.

41. Davies NM, Anderson KE.
Clinical pharmacokinetics of diclofenac.
Clin Pharmacokinet 1997;33:184–213.
42. 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.
43. Davies NM. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen.
The first 30 years.
Clin Pharmacokinet 1998;34:101–54.
44. Davies R, Brodgen RN.
Nimesulide an update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy.
Drugs 1994;48:431–54.
45. Davies NM, Sharkey KA, et al.
Aspirin causes rapid up–regulation of cyclooxygenase–2 expression in the rat stomach.
Aliment Pharmacol ther 1997;11:1101–08.
46. Day R, Morrison B, Luza A, et al.
A randomized trial of the efficacy and tolerability of the COX–2 inhibitor rofecoxib vs ibuprofen in patients with osteoarthritis.
Arch Intern Med 2000;160:1781–1787.
47. Day RO et al.
Naproxen concentrations in plasma and synovial fluid and effects on prostanoid concentrations.
J Rheumatol 1995;22:2295–303.
48. De Lean A, Munson PJ, Rodbard D.
Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves:application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose–response curve.
Am J Physiol 1978; 235:E97–E102.
49. 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.
50. Degner F, Türck D, Pairet M. Meloxicam.
Pharmacological, pharmacokinetic and clinical profile.
Drugs of Today 1998; 34 (A Suppl):1–22.
51. DeWitt DL, Smith WL.
Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence.
Proc Natl Acad Sci 1988; 85:1412–6.
52. Desjardins PJ, Grossman EH, Kuss ME, Talwalker S, Dhadda S, Baum D, Hubbard RC.
The injectable cyclooxygenase–2–specific inhibitor parecoxib sodium has analgesic efficacy when administered preoperatively.
Anesth Analg 2001;93:721–7.
53. Dickson D, Lee S, Mattiace L, Yen SH, Brosnan C.
Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease.
Glia 1993;7:75–83.
54. Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ et al.
Renal abnormalities and an alterated inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase 2.
Nature 1995; 273:406–9.

55. Distel M, Mueller C, Bluhmki E, Fries J.
Safety of meloxicam:a global analysis of clinical trials.
Br J Rheum 1996;35 (suppl1):68–77.
56. Dolan S, Nolan AM.
N–methyl D–aspartate induced mechanical allodynia is blocked by nitric oxide synthase and COX–2 inhibitors.
Neuroreport 1999;10:449–52.
57. Doraiswamy P, Krishen A, Stallone F, Martin W, Potts N, Metz A, De Veaugh–Geiss J.
NSAIDs and cognition in Alzheimer's disease.
Neurology 1996; 47:1194.
58. Dray A, Urban L.
New pharmacological strategies for pain relief.
Ann Rev Pharmacol Toxicol 1996; 36:253–80.
59. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS et al.
Cyclooxygenase in biology and disease.
FASEB J 1998; 12:1063–73.
60. Elder DJE, Hague A, Hicks DJ, Paraskeva C.
Differential growth inhibition by the aspirin metabolite salicylate in human colorectal tumor cell lines: enhanced apoptosis in carcinoma cell lines.
Cancer Res 1996; 56:2273–6.
61. Engelhard G, Bögel R, Schnitzler C, Utzmann T.
Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part I: In vitro findings
Biochem Pharmacol 1996;51:21–28.
62. Euler US et al.
Zur kenntnis der pharmakologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extracten männlicher accessorischer Geschlechtdrüsen.
Arch Exp Path Pharmakol 1934;975:78–84.
63. Evans AM.
Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the profens: enantioselectivity, clinical implications, and special reference to S(+)–ibuprofen.
J Clin Pharmacol 1996; 36:7S–15S.
64. Faust TW et al.
Effects of aspirin on gastric mucosal prostaglandin E2 and F2a content and on gastric mucosal injury in humans receiving fish oil or olive oil.
Gastroenterology 1990;98:586–91.
65. Feldman M, McMahon AT.
Do cyclooxygenase–2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti–inflammotory drugs, with less gastrointestinal toxicity?
Ann Intern Med 2000;123:134–43.
66. Feldman M, Shewmake K, Cryer B.
Time course inhibition of gastric and platelet COX activity by acetylsalicylic acid in humans.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000;279:G1113–1120.
67. Ferretti A, Flanagan VP, Reeves VB.
Stable isotope dilution assay for prostaglandin E metabolite:24–hour urinary output in healthy male subjects.
Anal Biochem 1987;167:174 80.
68. Fitzgerald GA, Brash AR, Falardeau P, Oates JA.
Estimated rate of prostacyclin secretion into the circulation in normal man.
J Clin Invest 1981;68:1271–74.
69. Fitzgerald GA, Patrono C.
The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase–2.
N Engl J Med 2001 345;6:433–42.

70. Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR.
Structure of the mitogen–inducible TIS10 gene and demonstration that TIS10–encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase.
J Biol Chem. 1992; 267:4338–44.
71. Futaki N. et al.
NS–398, a new anti–inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX–2) activity in vitro.
Prostaglandins 1994; 47:55–9.
72. Gaetani P, Marzatico F, Rodriguez y Baena R, Pacchiarini L, Vogano T, Grignani G, Crivellari MT, Benzi G.
Arachidonic acid metabolism and pathophysiologic aspects of subarachnoid hemorrhage in rats.
Stroke 1990; 21:328–32.
73. Garcia Rodriguez LA, Cattaruzzi C, Troncon MG, Agostinis L.
Risk of hospitalization for upper gastrointestinal bleeding associated with ketorolac, other NSAIDs, calcium antagonist and other antihypertensive drugs.
Arch Intern Med 1998; 158:33–9.
74. Giardiello FM, Offerhaus GJA, DuBois RN.
The role of nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal cancer prevention.
Eur J Cancer 1995; 31A:1071–6.
75. Giercksky KE, Huseby G, Rugstad HE.
Epidemiology of NSAID–related gastrointestinal side effects.
Scand J Gastroenterol 1989;24 (Suppl 163):3–8.
76. Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K, Isakson PC.
Kinetic basis for selective inhibition of cyclo–oxygenases.
Biochem J 1999;339:607–14.
77. Gierse JK, McDonald JJ, Hauser SD, Rangwala SH, Koboldt CM, Seibert K.
A single amino acid difference between cyclooxygenase–1 (COX–1) and –2 (COX–2) reverses between the selectivity of COX–2 selective inhibitors.
J Biol Chem 1996;271:15810–4.
78. Gilroy DW et al.
Inducible cyclooxygenase may have anti–inflammatory properties.
Nat Med 1999;5:698–701.
79. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE.
Aspirin and the risk of colorectal cancer in women.
N Engl J Med 1995;333:609–614.
80. Glaser K et al.
Etodolac selectively inhibits human prostaglandin G/H synthase 2 (PGHS–2) versus human PGHS–1.
Eur J Pharmacol 1995;281:107–11.
81. Goldblatt MW.
Properties of human seminal plasma.
J Physiol (Lond) 1935;84:208–18.
82. Goldstein JL, Silverstein FE, Agrawal NM, et al.
Reduced risk of upper gastrointestinal ulcer complications with celecoxib, a novel COX–2 inhibitor.
Am J Gastroenterol 2000;95:1681–90.
83. Gottesdiener KM, Schnitzler T, Fisher C, et al.
MK–663 Osteoarthritis Phase II Study Group. MK–663, a specific COX–2 inhibitor for treatment of osteoarthritis (OA) of the knee.
63rd annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, Nov 13–17, 1999, Boston, MA.

84. Griffin DE, Wesselingh SL, Mc Arthur JC.
Elevated central nervous system prostaglandins in human immunodeficiency virus–associated dementia.
Ann Neurol 1994;35:592–597.
85. Gross G et al.
Inhibition of cyclooxygenase–2 prevents inflammation–mediated preterm labor in the mouse.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000;278:R1415–23.
86. Gross GA, et al.
Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor.
Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:11875–9.
87. Grossman CJ, Wiseman J, Lucas FS, Trevethick MA, Birch PJ.
Inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase activity in human platelets and mononuclear cells by NSAIDS and COX 2 inhibitors.
Inflamm Res 1995;44:253–7.
88. Gustafson–Svard C, Lilja I, Hallbook O, Sjodahl R.
Cyclooxygenase–1 and cyclooxygenase–2 gene expression in human colorectal adenocarcinomas and in azomethane induced colonic tumours in rats.
Gut 1996;38:79–84.
89. Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Staiano–Coico L, Shiff SJ, Rigas B.
Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin–independent pathway.
Biochem Pharmacol 1996;52:237–245.
90. 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;94:2504–10.
91. Hastings TG.
Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H–synthase.
J Neurochem 1995;64:919–24.
92. Hawkey C, Kahan A, Steinbruck K, Alegre c et al.
Gastrointestinal tolerability of meloxicam compared to diclofenac in osteoarthritis patients.
Internatioanl MELISSA Study Group Meloxicam Large–scale International Study Safety Assessment.
Br J Rheumatol 1998;37:937–45.
93. Hawkey C, 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;43:370–377.
94. Hawkey CJ, Laine L, Harper SE, Quan HU, Bolognese JA, Mortensen E.
Influence of risk factors on endoscopic and clinical ulcers in patients taking rofecoxib or ibuprofen in two randomized controlled trials.
Aliment Pharmacol Ther. 2001 Oct;15(10):1593–601
95. Hla T, Neilson K.
Human cyclooxygenase–2 cDNA.
Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:7384–8.
96. Hofman FM, Von Hanwehr RI, Dinarello CA, Mitzel SB, Hinton D, Merrill JE.
Immunoregulatory molecules and Il–2 receptors identified in multiple sclerosis brain.
J Immunol 1986;136:3239–45.
97. Hosie J, Distel M, Bluhmki E.
Meloxicam in osteoarthritis:a 6–month, double–blind comparison with diclofenac sodium.
Br J Rheumatol 1996;35(1 Suppl):39–43.

98. Houchen CW et al.
Disruption of the cyclooxygenase–1 gene results in an impaired response to radiation injury.
Am J Pathol 2000;279:G858–865.
99. Hubbard RC, Kuss ME, LeComte DL, Pan X, Talwalker S, Geis GS.
An endoscopic study of the gastroduodenal effects of Sc–69124A, a parenteral COX–2 specific inhibitor, in the elderly.
Gastroenterology 2000;118(4, Suppl. 2, Part 1):A250.
100. Hubbard RC, Kuss ME, Daniels SE.
Parecoxib, a new parenteral COX–2 specific inhibitor with an enhanced analgesic profile.
Worldwide Pain Conf (July 15–21, San Francisco) 2000, 148.
101. Hudson N et al.
Effect of Helicobacter Pylori colonisation on gastric mucosal eicosanoid syntheis in patients taking non–steroidal anti–inflammatory drugs.
Gut 1993;34:748–51.
102. Hunt RH, Bowen B, Mortensen ER, Simon TJ, James C, Cagliola A, Quan H, Bolognese JA.
A randomized trial measuring fecal blood loss after treatment with rofecoxib, ibuprofen, or placebo in healthy subjects.
Am J Med 2000 Aug 15;109(3):201–6.
103. Iadecola C, Forster C, Nogawa S, Clark HB, Ross ME.
Cyclooxygenase–2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia.
Acta Neuropathol 1999;98:9–14.
104. Inoue H, Yokoyama C et al.
Transcriptional regulation of human prostaglandin–endoperoxide synthase–2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for IL–6 expression and camp response element.
J Biol Chem 1995;270:24965–71
105. Jacoby RF, Cole Ce et al.
Chemopreventive efficacy of combined piroxicam and difluoromethylornithine treatment of APC mutant Min mouse adenomas, and selective toxicity against APC mutant embryos.
Cancer Res 2000;60:1874–70.
106. Joshita H, Asano T, Hanamura T, Takakura K.
Effect of indomethacin and free radical scavenger on cerebral blood flow and oedema after cerebral artery occlusion in cats.
Stroke 1989;20:788–94.
107. Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, Nedelec E, Netter P.
Cyclo–oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thincking about nonsteroidal anti–inflammatory drugs.
Drugs 1997;53:563–82.
108. Ju J, Masferrer J, Seibert K, Raz A, Needleman P.
The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes.
J Clin Invest 1990;86:1375–9.
109. Kalgutkar AS, Crew BC, Rowlinson SW, Garner C, Seibert K, Marnett LJ.
Aspirin–like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase–2.
Science 1998;280:1268–70.
110. Karim A, Laurent A, Kuss M, Hubbard R, Qian J.
Single dose tolerability and pharmacokinetics of parecoxib sodium, a COX–2 specific inhibitor following intramuscular administration.
Annu Meet Am Soc Anesthesiol (ASA) (Oct 14–18, San Francisco) 2000, Abst A–944 et 945

111. Karim A, Laurent A, Slater ME, Kuss M, Qian J, Crossby–Sessoms SL, Hubbard R.
A pharmacokinetic study of intramuscular (i.m.) parecoxib sodium in normal subjects.
J Clin Pharmacol 2001;41:1111–9
112. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS.
Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase–2 inhibitor, against colon carcinogenesis.
Cancer Res 1998;58:409.
113. Kirtikara K, Morham SG, Raghow R, Laulederkind SJ, Kanekura T, Goorha S et al.
Compensatory prostaglandin E2 biosynthesis in cyclooxygenase 1 or 2 null cells.
J Exp med 1998;187:517–23.
114. Klang RY, Freire–Moar J, Sigal E, Chu CQ.
Expression of cyclooxygenase–2 in human and in animal model of rheumatologic arthritis.
Br J Rheum 1996;35:711–8.
115. Klein T et al.
Mechanistic studies on the selective inhibition of cyclooxygenase–2 by indanone derivatives.
Biochem Pharmacol 1996;51:285–90.
116. Knapp DJ, Crews FT.
Induction of cyclooxygenase–2 in brain during acute and chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal.
Alcohol Clin Exp Res 1999;23:633–43.
117. Komhoff M, Wang JL, Cheng HF, et al.
Cyclooxygenase-2 selective inhibitors impair glomerulogenesis and renal cortical development.
Kidney Int 2000;57:414–22.
118. Konstam MA, Weir MR, Reicin A, Shapiro D, et al.
Cardiovascular thrombotic events in controlled, clinical trials of rofecoxib.
Circulation 2001;104:2280–2288.
119. Kriegel W, Korff KJ, Ehrlich JC, Lehnhardt K et al.
Double–blind study comparing the long–term efficacy of the COX–2 inhibitor nimesulide and naproxene in patients with osteoarthritis.
Int J Clin Pract 2001;55:510–4.
120. Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, White RL, Prescott SM.
Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer:evidence for a transcriptional effect.
Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:4816–20.
121. Laine L, Sloane R, Ferretti M, Cominelli F.
A randomised, double–blind comparison of placebo, etodolac, and naproxen on gastrointestinal injury and prostaglandin production.
Gastrointest Endosc 1995;42:428–33.
122. Laine L, Harper S, Simon T, Bath R, Johanson J, Schwartz H, Stern S, Quan H, Bolognese J.
A randomized trial comparing the effect of rofecoxib, a cyclooxygenase 2–specific inhibitor, with that of ibuprofen on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis.Rofecoxib Osteoarthritis Endoscopy Study Group.
Gastroenterology 1999 Oct;117(4):776–83.
123. Laird JMA, Herrero JF, Garcia de la Rubia P, Gervero F.
Analgesic activity of the novel COX–2 preferring NSAID, meloxicam, in mono–arthritic rats:central and peripheral components.
Inflamm Res 1997;46:203–10.

124. Lane NE.
Pain management in osteoarthritis:the role of COX–2 inhibitors.
J Rheum 1997;24:20–24.
125. Laneuville O. et al.
Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases–1 and –2 by nonsteroidal anti–inflammatory drugs.
J Pharm Exp Ther 1994;271:927–934.
126. Langeland FF, Turpin M, Waller P, Kuss ME, LeComte DL, Dhadda SS.
A Comparative analgesic efficacy study of parecoxib, a new COX–2 specific inhibitor, in post–gynecologic surgery patients.
19th Annu Sci Meet Am Pain Soc (Nov 2–5, Atlanta) 2000, Abst 814.
127. Langenbach R, et al.
Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid–induced inflammation and indomethacin–induced gastric ulceration.
Cell 1995;83:483–492.
128. Langman MJ, Jensen DM, Watson DJ, et al.
Adverse upper gastrointestinal effects og rofecoxib compared with NSAIDs.
JAMA 1999;282:1929–33
129. Lanza FL, Rack MF, Simon TJ, Quan H, Bolognese JA, Hoover ME, Wilson FR, Harper SE.
Specific inhibition of cyclooxygenase–2 with MK–0966 is associated with less gastroduodenal damage than either aspirin or ibuprofen.
Aliment Pharmacol Ther 1999 Jun;13(6):761–7
130. Laufler S, Zechmeister P, Klein T.
Development of an in–vitro system for the evaluation of cyclooxygenase–2 inhibitors.
Inflamm Res 1999;48:133–8.
131. Lee M, Cryer B, Feldman M.
Dose effects of aspirin on gastric prostaglandins and stomach mucosal injury.
Ann intern Med 1994;120:184–9.
132. Lichtenstein DR, Syngal S, Wolfe MM.
Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract:the double–edged sword.
Arthritis Rheum 1995;1:5–18.
133. Lim H, et al.
Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2–deficient mice.
Cell 1997;91:197–208.
134. Lipsky P, Abramson SB, Crofford L, Dubois RN, Simon LS, Van de Rutte LBA. (The international COX–2 study group).
The classification of cyclooxygenase inhibitors.
J Rheumatol 1998;25:2298–2303.
135. Lipsky PE, Isakson PC.
Outcome of specific COX–2 inhibition in rheumatoid arthritis.
J Rheumatol. 1997;24:9–14.
136. Lipton SA.
Aids–related dementia and calcium homeostasis.
Ann NY Acad Sci 1994;747:205–24.
137. Liu CH, et al.
Over–expression of cyclooxygenase (Cox)–2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice.
J Biol Chem 2001;276:18563–69
138. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al.
Inhibition of cyclooxygenase–2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo.
J Urol 2000;164:820–25.

139. Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, Browner M.
Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase–2.
Nature Struct Biol 1996;3:927–33.
140. Malmström K, Kotey P, Coughlin RN, et al.
Efficacy of etoricoxib, naproxen sodium, and acetaminophen/codeine in acute dental pain.
Clin Pharm Ther 2001(février):PI–6.
141. Marx J.
Anti–inflammatories inhibit cancer growth–but how ?
Science 2001;291:581–2.
142. Matsuo Y, Izumiyama M, Onodera H, Kurosawa A, Kogure K.
Effect of a novel thromboxan A2 receptor antagonist, S–1452, on postischemic brain injury in rats.
Stroke 1993;24:2059–64.
143. Mattammal MB, Strong R, Lakshmi VM, Chung HD, Stephenson AH.
Prostaglandin H synthetase–mediated metabolism of dopamine:implication of Parkinson's disease.
J Neurochem 1995;64:1645–54.
144. McAdam BF, Catella–Lawson F et al.
Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX–2):the human pharmacology of a slective inhibitor of COX–2.
Proc natl Acad Sci USA 1999;96:272–7.
145. McAdam BF, Mardini I, Habib A, et al.
Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation.
J Clin Invest 2000;105:1473–1482.
146. McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG.
Arthritis and anti–inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease:a review of 17 epidemiologic studies.
Neurology 1996;47:425–32.
147. Meade E.A. et al.
Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non–steroidal anti–inflammatory drugs.
J. Biol. Chem. 1993;268:6610–14.
148. Mehlisch D, Kuss M, Bauman A, Baum D, Karim A, Hubbard R.
Correlation of pharmacokinetics (PK) with onset and duration of analgesia of intramuscular doses of parecoxib, in postoperative dental pain.
Clin Pharmacol Ther 2000;67(2):Abst PIII–7
149. Meng W, Colonna DM, Tobin JR, Busija DW.
Nitric oxide ans prostaglandins interact to mediate arteriolar dilatation during cortical spreading depression.
Am J Physiol 1995;269:H176–81.
150. Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P.
Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase).
J Biol Chem 1988;263:3550–3.
151. Mitchell J.A. et al.
Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase.
Proc Natl Acad Sci USA 1994, 90:11693–7.
152. Miyamoto K, Oka N, Kawasaki T, Satoi H, Akiguchi I,et al.
The effect of cyclooxygenase–2 inhibitor on experimental allergic neuritis.
Neuroreport 1998;13:2331–4.

153. Mizuno H et al.
Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice.
Gastroenterology 1997;112:387–97.
154. Morgan GJ Jr, Kaine J, DeLapp R, Palmer R.
Treatment of elderly patients with nabumetone or diclofenac:gastrointestinal safety profile.
J Clin Gastroenterol 2001 Apr;32(4):310–4
155. Morham SG, Langenbach R, Loftin CD et al.
Prostaglandin synthase 2 disruption causes severe renal pathology in the mouse.
Cell 1995;83:473–82.
156. Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW.
Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis.
Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:7950–4.
157. Morrison BW, Fricke J, Brown J, Yuan W, Kotey P, Mehlisch D.
The optimal analgesic dose of rofecoxib: Overview of six randomized controlled trials.
J Am Dent Assoc 2000 Dec;131(12):1729–37.
158. Morteau O, Morham S, Sellon R, Boroviov J, et al.
Genetic deficiency in cyclooxygenase–2 but not in cyclooxygenase–1 exacerbated DSS–induced colitis. Gastroenterology 1997;112:A194.
159. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ.
Risk of cardiovascular events associated with selective COX–2 inhibitors.
JAMA 2001;286:954–9.
160. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, et al.
Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane–associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase–2.
J Biol chem 2000;275:32783–32792.
161. Muscara MN, Vergnolle N, Lovren F, et al.
Selective cyclo–oxygenase–2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence.
Br J Pharm 2000;129:1423–30.
162. Nantel F, Meadows E, Denis D, Connolly B, Metters KM, Giaid A.
Immunolocalization of cyclooxygenase–2 in the macula densa of human elderly.
FEBS Lett. 1999 Sep 3;457(3):475–7.
163. Narumiya S, Fitzgerald GA.
Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function.
J Clin Invest 2001;108:25–30.
164. Neupert W, Brugger R, Euchenhofer C, Brune K, Geisslinger G.
Effects of ibuprofen enantiomers and its coenzyme A thioesters on human prostaglandin endoperoxide synthases.
Br J Pharmacol 1997;122:487–92.
165. Nishimura G, Yanoma S, Mizuno H et al.
A selective cyclooxygenase–2 inhibitor suppresses tumour growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous carcinoma cells.
Jpn Cancer Res 1999;90:1152–62.
166. Noveck RJ.
Parecoxib sodium does not impair platelet function in healthy elderly and non–elderly individuals. Two randomized, controlled trials.
Clin Drug Invest 2001;21:465–76.
167. O'Neill GP, et al.
Overexpression of human prostaglandin G/H synthase–1 and –2 by recombinant vaccinia virus:inhibition by nonsteroidal anti–inflammatory drugs and biosynthesis of 15–hydroxyeicosatetraenoic acid.
Mol Pharmacol 1994;45:245–54.

168. Oates JA.
The 1982 Nobel prize in physiology or medicine.
Science 1982;218:765–768.
169. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM.
Suppression of intestinal polyposis in Apc716 knochout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX–2).
Cell 1996;87:803–9.
170. Oshima M, Murai N, Kargman S, et al.
Chemoprevention of intestinal polyposis in APCD716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase–2 inhibitor.
Cancer Res 2001;61:1733–40.
171. Pairet M et al.
Meloxicam:cyclooxygenase selectivity, anti–inflammatory activity and gastric and renal safety.
Inflamm Res 1995;44(suppl 3):S274.
172. 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.
173. Pairet M.
Inhibition of cyclooxygenase–1 and cyclooxygénase–2. Analysis of in vitro test systems and their clinical relevance.
J Clin Rheumatol 1998;4:S17–S31.
174. Palmer BF, Henrich WL.
Clinical acute renal failure with Nonsteroidal Anti–inflammatory Drugs.
Semin Nephrol 1995;15(3):214–27.
175. Panara MR, Padovano R, Sciulli MG, Santini G, Renda G, et al.
Effects of nimesulide on constitutive and inducible prostanoid biosynthesis in man.
Clin Pharmacol Ther 1998;63:672–81.
176. Panara MR, Renda G, Sciulli MG, Santini G, Di Giamberardino M, et al.
Dose–dependent inhibition of platelet cyclooxygenase–1 and monocyte cyclooxygenase–2 by meloxicam in healthy subjects.
J Pharmacol Exp Ther 1999;290:276–80.
177. Patel P, Drummond J, Sano T, Cole D, Kalkman C, Yaksh T.
Effect of ibuprofen on regional eicosanoid production and neuronal injury after forebrain ischemia in rats.
Brain Res 1993;614:315–24.
178. Patoia L, Santucci L, Furno P et al.
A 4–week, double–blind, parallel–group study to compare the gastrointestinal effects of meloxicam 7.5 mg, meloxicam 15 mg, piroxicam 20 mg and placebo by means of faecal blood loss, endoscopy and symptom evaluation in healthy volunteers.
Br J Rheumatol 1996;35 (suppl 1):61–97.
179. Patrignani P, et al.
Differential inhibition of the cyclooxygenase activity of prostaglandin endoperoxide synthase isoenzymes in vitro and in vivo in man.
Prostaglandins Leukot Essent Faty Acids 1996;55(suppl 1). Abstract:P115.
180. 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

181. Patrignani P. et al.
Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases.
J Pharmacol Exp Ther, 1994, 271:1705–12.
182. Patrono C, Ciabattoni G, Pinca E, et al.
Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B2 production in healthy subjects.
Thromb Res 1980;17:317–27.
183. Patrono C, Wennmalm A, Ciabattoni G, Nowak J, Pugliese F, Cinotti GA.
Evidence for an extra–renal origin of urinary prostaglandin E2 in healthy men.
Prostaglandins 1979;18:623–9.
184. Patrono C.
Aspirin as an antiplatelet drug.
N Engl J Med 1994;330:1287–94.
185. Patrono Cn Dunn MJ.
The clinical significance of inhibition of renal prostaglandin synthesis.
Kidney Int 1987;32:1–12.
186. Pealbeam CC, Fall PM, Alander CB, Raisz LG.
Differential effects od nonsteroidal anti–inflammatory drugs on constitutive and inducible prostaglandin G/H synthase in cultures bone cells.
J Bone Miner Res 1997;12:1198–1203.
187. Pellissier JM, Straus WL, Watson DJ, Kong SX, Harper SE.
Economic evaluation of rofecoxib versus nonselective nonsteroidal anti–inflammatory drugs for the treatment of osteoarthritis.
Clin Ther 2001 Jul;23(7):1061–79
188. Pfaffenrath V, Scherzer S.
Analgesics and NSAID in the treatment of the acute migraine attack.
Cephalalgia 2000;15:14–20.
189. Piazza GA, Alberts DS, Hixson LJ, Paranka NS, Li H, Finn T, Bogert C, Guillen JM, Brendel K, Gross PH, Spert G, Ritchie J, Burt RW, Ellsworth L, Ahnen DJ, Pamukcu R.
Sulindac sulfone inhibits azomethane–induced colon carcinogenesis in rats without reducing prostaglandin levels.
Cancer Res 1997;57:2909–15.
190. Picot D, Loll PJ, Garavito RM.
The X–ray crystal structure of the memebrane protein prostaglandin H2 synthase–1.
Nature 1994;367:243–9.
191. Prasit P et al.
L–745,337:a selective cyclooxygenase–2 inhibitor.
Med Chem Res 1995;5:364–74.
192. Prescott SM, et al.
Self–promotion ? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase 2.
Cell 1996;87:783–6.
193. Presle N, Lapicque F, Gillet P, Hermann MA, Bannwarth B, Netter P.
Effect of dimethicone (polysilane gel) on stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen.
Eur J Clin Pharmacol 1998;54:351–4.
194. Qiao L, Shiff SJ, Rigas B.
Sulindac sulfide inhibits the proliferation of colon cancer cells:diminished expression of the proliferation markers PCNA and ki–67.
Cancer Lett 1997;115:229–34.
195. Raz A, Wyche A, Siegel N, Needleman P.
Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin
J Biol Chem 1988;263:3022–8.

196. Reilly IAG, Fitzgerald GA.
Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo:implications for therapy with platelet inhibitory drugs.
Blood 1987;69:180–6.
197. Reuter BK, Asfaha s, et al.
Exacerbation of inflammation–associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase–2.
J Clin Invest 1996;98:2076–85.
198. Richards JS, Fitzpatrick SL, Clemens JW, Morris JK, Alliston T, Sirois J.
Ovarian cell differenciation:a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes.
Rec Prog Hormone Res 1995;50:223–54.
199. Riendeau D et al.
Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX–2 inhibitor.
Br J Pharmacol 1997;121:105–17.
200. Riendeau D, Percival MD, Brideau C, 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.
201. Roberts LJ, Sweetman BJ, Oates JA.
Metabolism of thromboxane B2 in man.
J Biol Chem 1981;256:8384–93.
202. Rogers J, Kirby L, Hempelman S, Berry D, Mc Geer P, Kasznaik A, Zalinski J, Cofield M, Mansukhani L, Wilson P, Kogen F.
Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease.
Neurology 1993;43:1609–11.1993
203. Roth SH, Tindall EA, Jain AK, McMahon FG, April PA, Bockow BI, Cohen SB, Fleischmann RM.
A controlled study comparing the effects of nabumetone, ibuprofen, and ibuprofen plus misoprostol on the upper gastrointestinal tract mucosa.
Arch Intern Med. 1993 Nov 22;153(22):2565–71.
204. Roth SH.
Modalités d'utilisation de la nabumétone et expérience clinique.
Drugs 2000;59 (special issue 1):35–41.
205. Saag K, van der Heijde D, Fisher C, Samara A, DeTora L, Bolognese J, Sperling R, Daniels B.
Rofecoxib, a new cyclooxygenase 2 inhibitor, shows sustained efficacy, comparable with other nonsteroidal anti–inflammatory drugs:a 6–week and a 1–year trial in patients with osteoarthritis. Osteoarthritis Studies Group.
Arch Fam Med. 2000 Nov–Dec;9(10):1124–34
206. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES et al.
Cyclooxygenase–2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice.
Am J physiol 1998;274(6Pt1):G1061–7.
207. Scarpignato C.
Nonsteroidal anti–inflammatory drugs:how do they damage gastroduodenal mucosa ?
Dig Dis 1995;13(suppl 1):9–39.
208. Schoen RT, Vender RJ.
Mechanisms of nonsteroidal anti–inflammatory drug–induced gastric damage.
Am J Med 1989;86:449–58.

209. Schoenfeld P.
Gastrointestinal safety profile of meloxicam:a meta–analysis and systematic review of randomized controlled trials.
Am J Med 1999 Dec 13;107(6A):48S–54S.
210. Schwartz JI, Chan CC, Mukhopadhyay S, McBridge KJ, Jones TM et al.
Cyclooxygenase–2 inhibition by rofecoxib reverses naturally occuring fever in humans.
Clin Pharmacol Ther 1999;65:653–60.
211. Schwartz JI, Malice MP, Kalyani R, Lasseter K, Holmes GB, et al.
Effect of rofecoxib, celecoxib, and naproxen on blood pressure (BP) in elderly volunteers.
AJH–Avril 2001–Vol. 14, NO. 4, Part 2.
212. Scott KF, Bryant KJ, Bidgood MJ.
Functional coupling and differential regulation of phospholipase A2–cyclooxygenase pathways in inflammation.
J Leukocyte Biol 1999;66:535.
213. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, et al.
Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain.
Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:12013–12017.
214. Seybert HW, Sweetman BJ, Frölich JC, Oates JA.
Quantification of the major urinary metabolite of type E–prostaglandins by mass spectrometry:evaluation of the method's application to clinical studies.
Prostaglandins 1976;11:381–97.
215. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey R, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN.
Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase–2.
J Clin Invest 1997;99:2254–9.
216. Shield MJ.
Diclofenac/misoprostol:novel findings and their clinical potential.
J Rheumatol 1998;25 (suppl 51):31–41.
217. Shigeta J et al.
Role of cyclooxygenase–2 in the healing of gastric ulcers in rats.
J Pharm Exp Ther 1998;286:1383–90.
218. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, et al.
Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti–inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis.
JAMA 2000;284:1247–55.
219. Silverstein FE, Graham DY, Senior JR, et al.
Misoprostol reduces serious gastrointestinal complications in patients with rheumatoid arthritis receiving nonsteroidal and anti–inflammatory drugs:a randomized, double blind, placebo–controlled trial.
Ann Intern Med 1995;123:241–9.
220. 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.
221. 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;282:1921–1928.

222. Sirois J, et al.
Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro;
J Biol Chem 1992;267:11586–92.
223. Slater D et al.
The relative abundance of type 1 to type 2 cyclo–oxygenase mRNA in human amnion at term.
Biochem Biophys Res Commun 1994;198:304–8.
224. Smalley W, DuBois RN.
Colorectal cancer and non steroidal anti–inflammatory drugs.
Adv Pharmacol 1997;39:1–20.
225. Smith WL, Langenbach R.
Why there are two cyclooxygenase isoenzymes.
J Clin Invest 2001;107:1491–5.
226. Sorbera LA, Castaner RM, Silvestre j et al.
Etoricoxib;analgesic drug, antiarthritic cyclooxygenase–2 inhibitor.
Drugs of the Future 2001;26(4):346–53.
227. Stalnikowicz DR.
Gastrointestinal bleeding during low–dose aspirin administration for prevention of arterial occlusive events:a critical analysis.
J Clin Gastroenterol. 1995;21:13–16.
228. Steinbach G et al.
The effect of celecoxib, a cyclooxygenase–2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis.
N Engl J Med 2000;342:1946–52.
229. Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ.
Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use.
Neurology 1997;48:626–32.
230. Stichtenoth DO, Wagner B, Frölich JC.
Effect of selective inhibition of the inducible cyclooxygenase on renin release in healthy volunteers.
J Clin Invest Med 1998;46:290–6.
231. Stichtenoth DO, Wagner B, Frölich JC.
Effects of meloxicam and indomethacin on cyclooxygenase pathways in healthy volunteers.
J Invest Med 1997;45:44–49.
232. Stolina M, Sharma S, Lin Y, et al.
Specific inhibition of cyclooxygenase–2 restores antitumour reactivity by altering the balance of Il–10 and IL–12 synthesis.
J Immunol 2000;164:361–70.
233. Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A.
Distribution and function of prostanoid receptors:studies from knockout mice.
Prog Lipid res 2000;39:289–314.
234. Swan SK, Rudy DW, Lasseter KC, et al.
Randomized evaluations of the effects of cyclooxygenase–2 inhibition on renal function in elderly persons receiving low–salt diet:a randomized, controlled trial.
Ann Intern Med 2000;133:1–9.
235. Taha AS et al.
Effect on gastric and duodenal mucosal prostaglandins of repeated intake of therapeutic doses of naproxen and etodolac in rheumatoid arthritis.
Ann Rheum Dis 1990;49:354–8.

236. Talley JJ, Brown DL, Carter JS, et al.
4-[5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]-benzenesulfonamide, valdecoxib:apotent and selective inhibitor of COX-2.
J Med Chem 2000;43:775-7.
237. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, et al.
J Biol Chem 2000;275:32775-32782.
238. Tegeder I, Lötsch J, Krebs S, Muth-Selbach U, Brune K, Geisslinger G.
Comparison of inhibitory effects of meloxicam and diclofenac on human thromboxane biosynthesis after single doses and at steady state.
Clin Pharmacol Ther 1999;65:533-44.
239. Thompson HJ, Jiang C, Lu JX, Mehta RG, Piazza GA, Paranka NS, Pamukcu R, Ahnen DJ.
Sulfone metabolite of sulindac inhibits mamary carcinogenesis.
Cancer Res 1997;57:267-71.
240. Thorson AG, Lynch HT, Smyrk TC.
Rectal cancer in FAP patients after sulindac (letter).
Lancet 1994;343:180.
241. Thun MJ.
NSAID use and decreased risk of gastrointestinal cancers.
Gastroenterol Clin North Am 1996;25:333-48.
242. Tiano H, Chulada P et al.
Effects of cyclooxygenase deficiency on inflammation and papilloma development in mouse skin.
Proc Am Assoc Cancer Res 1997;38:257.
243. Torrance CJ, Jackson PE et al.
Combinatorial chemoprevention of intestinal neoplasia.
Nat Med 2000;6:1024-8.
244. Tsujii M, DuBois RN.
Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2.
Cell 1995;83:493-501.
245. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, Dubois RN.
Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells.
Cell 1998;93:705-16.
246. Vago T et al.
Effect of nimesulide action time dependence on selectivity towards prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase activity.
Arzneimittelforschung/Drud Res 1995;45:1096-8.
247. Van Hecken A, Schwartz JI, Depré M, De Lepeire I, et al.
Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers.
J Clin Pharmacol 2000;40:1109-20.
248. Vane JR, Botting RM.
Mechanism of action of aspirin-like drugs.
Semin Arthritis Rheum 1997;26:2-10.
249. Vane JR.
Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs.
Nature 1971;231:232-5.
250. Waddell WR, Loughry RW.
Sulindac for polyposis of the colon.
J Surg Oncol 1983;24:83-87.

251. Wallace JL.
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy:the second hundred years.
Gastroenterology 1997;112:1000-16.
252. Wallace JL, et al.
Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice:implications for gastrointestinal toxicity.
Gastroenterology 1998;115:101-109.
253. Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N.
NSAID-induced gastric damage in rats:requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2.
Gastroenterology 2000;119:706-14.
254. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR.
Nonsteroid drugs 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.
255. Watson DJ, harper SE, Zhao PL, Quan H, Bolognese JA et al.
Gastrointestinal tolerability of the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor rofecoxib compared with nonselective COX-2 inhibitors in osteoarthritis.
Arch Intern Med 2000;160:2998-3003.
256. Weil J, Colin JD, Langman M, et al.
Prophylactic aspirin and risk of peptic ulcer bleeding.
BMJ 1995;310:827-30.
257. Whelton A, Maurath CJ, Verburg KM, Geis GS.
Renal safety and tolerability of celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor.
Am J Ther 2000;7:159-75.
258. Whelton A.
Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2 specific inhibitors.
Am J Med 2001;110:Suppl 33-42.
259. Whelton A, Fort JG, Puma JA, Normandin D, Bello AE, et al.
Cyclooxygenase-2-specific inhibitors and cardiorenal function:a randomized, controlled trial of celecoxib and rofecoxib in older hypertensive osteoarthritis patients.
Am J Ther 2001;8:85-95.
260. White WB, Whelton A, Kent J, Verburg K.
Effects of the COX-2 specific inhibitor celecoxib on ambulatory blood pressure in hypertensive patients on ACE inhibition.
AJH-avril 2001-vol. 14, NO. 4, Part 2.
261. Wiese FM, et al.
Carcinogen substrate specificity of human COX-1 end COX-2.
Carcinogenesis 2001;22:5-10.
262. Wolfe M, Lichtenstein D, Singh G.
Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflmmatory drugs.
New Engl J Med 1999;340:1888-9.
263. Yamagata K, Anderasson KI, Kaufmann WE, et al.
Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neuron:regulation by synaptic activity and glucocorticoids.
Neuron 1993;11:371-86.
264. Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N.
Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor.
Brain Res 1996;739:104-110.

265. Yokoyama C, Tanabe T.
Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxyde synthetase and primary structure of the enzyme.
Biochem Biophys. Res. Commun. 1989;165:888–94.
266. Young JM, Panah S, et al.
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.
267. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R et al.
Effects of an angiotensin–converting–enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high–risk patients.
N Engl J Med 2000;342:145–53.
268. Zhao SZ, Reynolds MW, Lefkowith J, Whelton A, Arellano FM.
A comparisosn of renal–related adverse drug reactions between rofecoxib and celecoxib, based on the World Health Organisation/Uppsala Monitoring centre safety database.
Clin Ther 2001;23:1478–91.
269. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE et al.
Cyclooxygenase–2 expression in human oesophageal carcinoma.
Cancer Res 1999;59:198–204.

SCD-UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

CORRECTED PROOFS

Date . . . 12/12/01
Paper No. . .1533
No. pp 11

Limitation of the *in vitro* whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use

SCD-UHP - NANCY 1 BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

Hubert Blain,[1,3] Christelle Boileau,[1] Françoise Lapicque,[1] Emmanuelle Nédélec,[1] Damien Lœuille,[1] Cécile Guillaume,[1] Alain Gaucher,[2] Claude Jeandel,[3] Patrick Netter[1] & Jean-Yves Jouzeau[1]

[1]*Département de Pharmacologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire, UMR 7561, Centre National de la Recherche Scientifique-Université Henri Poincaré Nancy 1, Vandœuvre lès Nancy,* [2]*Service de Rhumatologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nancy and* [3]*Service de Médecine Interne et de Gérontologie, Centre Hospitalier Antonin Balmes, Montpellier, France*

Aims To assess if the inhibitory potency of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase (COX) isoenzymes, when given therapeutically in humans, can be predicted from their *in vitro* concentration-response curves using the whole blood assay.

Methods Twenty-four healthy male volunteers aged 20–27 years were recruited. Inhibition of blood COX isoenzymes was determined *in vitro* before any drug intake and *ex vivo* after single and repeated intake of either 7.5 mg meloxicam once, 400 mg ibuprofen three times daily or 75 mg diclofenac SR once, taken in a randomized cross-over design. Production of thromboxane B_2 (TXB_2) during clotting and of prostaglandin E_2 (PGE_2) during endotoxin exposure served as indicators of platelet COX-1 and monocyte COX-2 activity, respectively. Drugs were determined in plasma by h.p.l.c., with a chiral separation of ibuprofen and free fractions after equilibrium dialysis.

Results Intra-subject variation for COX-1 and COX-2 at baseline was at 26% (18%) and 18% (13%) respectively, and intersubject variation at 39% and 36%, respectively. The ratios of IC_{50}s and, at best, of IC_{80}s revealed diclofenac and meloxicam as selective COX-2 inhibitors and ibuprofen as a preferential COX-1 inhibitor *in vitro*. However, after oral intake, ibuprofen inhibited *ex vivo* COX-2 by 80% whereas diclofenac inhibited COX-1 by 70%. Meloxicam inhibited COX-1 from 30 to 55% depending on the repetition of the dose and increase in plasma concentrations. Using *in vitro* dose–response curves, the *in vivo* inhibitory potency of diclofenac was estimated adequately from its circulating concentration ([−0.18, 0.21] for COX-1 and [−0.13, −0.03] for COX-2) but this was not the case for ibuprofen on COX-2 ([−0.14, 0.27]) and meloxicam on COX-1 ([0.31, 1.05]). The limited predictability of the system was not improved through considering the unbound fraction of the drugs or the variable chiral inversion of ibuprofen.

Conclusions Assessment of COX-2 selectivity based on *in vitro* studies and pharmacological modelling has a limited clinical relevance. There is a need to investigate COX selectivity at therapeutic plasma concentrations of NSAIDs using the *ex vivo* whole blood assay.

Keywords: COX isoenzymes, enantioselectivity, NSAIDs, protein binding, whole blood assay

Introduction

The widely accepted mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is to inhibit the conversion of arachidonic acid (AA) into cyclic endoperoxides by the enzyme cyclooxygenase (COX, prostaglandin

Correspondence: Dr Patrick Netter, UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine, Avenue de la forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. E-mail: patrick.Netter@medecine.uhp-nancy.fr

Received 5 June 2001, accepted 25 October 2001.

© 2002 Blackwell Science Ltd

J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:07:59 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

endoperoxide synthase, PGHS) [1]. Since this last decade, we know that COX exists in at least two isoforms, COX-1 and COX-2, encoded by separate genes and thought to participate differently in physiological situations and disease processes [2, 3]. This new dichotomy, between the 'mostly physiological' COX-1 and the 'mostly pathological' COX-2, has generated a lot of studies comparing NSAIDs for their ability to inhibit both COX enzymes [4, 5]. A variety of *in vitro* enzyme and cell-based assay models have been developed for that purpose and to guide the discovery of new molecules [4, 5], based on the assumption that a marked inhibition of COX-2 without any significant inhibition of COX-1 may characterize NSAIDs with an improved side-effect profile [6]. In these systems, the selectivity of NSAIDs on COX activity is determined generally by the ratio of their IC_{50} (concentration of the drug inhibiting enzyme activity by 50%) values for COX-1 and COX-2 [4, 5, 7]. As a consequence, NSAIDs were classified by their relative potency on cyclooxygenase isoenzymes rather than by their chemical structure [8], although this new classification was mainly based on *in vitro* data collected from miscellaneous biological systems [8]. Unfortunately, each *in vitro* assay system has clear advantages but also certain drawbacks, inherent to the system itself, i.e. its clinical relevance [9], or related to the way the system has been manipulated, i.e. the experimental conditions used (reviewed in [7, 10]).

In an effort to be closer from the therapeutic use of NSAIDs, an extended classification of cyclooxygenase inhibitors has been proposed, considering the level of COX inhibition at pharmacologically relevant doses in animal models and humans, in addition to enzymatic or biochemical assays [11]. From that point of view, the whole blood assay using thromboxane B_2 (TXB_2) production during clotting, as an index of platelet COX-1 activity to endogenously formed thrombin, and prostaglandin E_2 (PGE_2) production during LPS stimulation, as an index of leucocytes COX-2 expression to bacterial endotoxins [12], has become a widely accepted system [13]. For *in vitro* pharmacological studies, this assay takes advantage of using whole cells that are pathophysiological targets for NSAIDs, of considering the intracellular transport of drugs, of providing a physiological plasma protein level and of checking for inhibition of both COX enzymes on a single sample [10]. Of primary importance for estimating the selectivity of NSAIDs towards COX enzymes, the whole blood assay can also be used to determine the degree of COX inhibition *in vivo* after an oral intake of therapeutic doses of the drug [12, 14]. As a close correlation has been reported between the inhibitory potency of NSAIDs on thromboxane synthesis by platelets and COX-1 activity in gastric mucosa [15], such *ex vivo* assay has a clear clinical relevance as long as the tissular concentrations of the drug are considered.

As an *in vitro* assay is easy to perform and spares time in comparison to clinical studies, authors have proposed to use the *in vitro* whole blood data for estimating the expected levels of COX inhibition from the circulating levels of NSAIDs [10, 12]. Such predicting approach is based on: (i) the use of COX inhibition curves obtained by the addition of a range concentration of NSAIDs to donated blood from few healthy subjects; (ii) the extrapolation of plasma concentrations into whole blood concentrations of drugs, assuming that NSAIDs do not enter red cells and that haematocrit is 45% [10, 12]. However, it has been underlined recently that the *ex vivo* whole blood assay is somewhat variable and that the level of COX inhibition depends clearly on the pharmacokinetics of NSAIDs [11]. As a consequence, an appropriate number of subjects might be required for a meaningful determination of NSAIDs selectivity [11] and COX inhibition should be reported at pharmacologically relevant times [14, 16] instead of an arbitrary time following drug administration [17].

In the present study, we investigated whether the data obtained with the *in vitro* whole blood assay provided an accurate estimation of the COX selectivity of NSAIDs in clinical use. For that purpose, we enrolled a sufficient number of healthy volunteers to establish the *in vitro* COX response curves of ibuprofen, diclofenac or meloxicam, chosen as non selective to COX-2 selective inhibitors, respectively [13]. We compared, subsequently, the levels of COX inhibition anticipated from these *in vitro* assays to the levels measured *ex vivo* in the same subjects after a single or a repeated oral intake of the drugs. Finally, as protein binding and drug metabolism may vary in pathological situations as inflammation, we investigated the predicting value of the free concentration of NSAIDs and, in the case of ibuprofen, the possible contribution of chiral inversion.

Methods

Subjects

Twenty-four male volunteers (age, 23 ± 2 years; height, 1.80 ± 0.08 m; mean $\pm$ s.d.) were enrolled in this study. Subjects were within 20% of ideal (Metropolitan Life Insurance tables) body-weight (mean weight, 68.8 kg; weight range, 52.0–96.0 kg) and generally healthy, based on physical examination and routine laboratory screening. Subjects with acute or chronic diseases, medical history of gastrointestinal ulcers or allergy against NSAIDs were not included. Subjects were not permitted to receive any other medication (including aspirin or NSAIDs) for 2 weeks before and throughout the duration of the study.

© 2002 Blackwell Science Ltd

J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:08:00 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

The study was approved by the Ethics Committee of Nancy (Nancy, France). Written informed consent was obtained from all study participants.

In vitro *study*

The effects of meloxicam (Bœhringer Ingelheim, Biberach, Germany), ibuprofen (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) and diclofenac (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) on platelet COX-1 and monocyte COX-2 activities were assessed after incubating increasing concentrations of each NSAID with peripheral whole blood samples drawn from all subjects. Drugs were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) and transferred into test tubes as 5 μl aliquots to provide final concentrations of NSAID ranging from 10^{-4} M to 10^{-9} M after addition of whole blood.

COX-1 activity was determined as previously described [12]. Briefly, fresh blood was collected from all volunteers, before any drug intake, into vacutainers containing no anticoagulants. Whole blood aliquots of 1 ml were immediately transferred into nonsiliconized glass tubes preloaded with DMSO alone or NSAID and allowed to clot for 1 h at 37°C. Serum was separated by centrifugation at 2000 rev min^{-1} for 10 min and stored at −80°C until ~~dosage~~. Serum TXB_2 levels were determined with an immunoassay kit according to the manufacturer's procedure (Cascade Biochem Limited, Bershire, UK).

COX-2 activity was determined as previously described [12]. Briefly, whole blood drawn from the same donors was immediately divided into 1 ml aliquots in test tubes containing 10 IU of sodium heparin (Choay, France) and 10 μg of aspirin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). After a 15 min incubation at 37°C to allow aspirin to inactivate irreversibly platelet COX-1, blood aliquots were further incubated for 24 h at 37°C in the presence or absence of 10 μg ml^{-1} LPS, derived from *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), and NSAID or vehicle alone (DMSO). Plasma was separated by centrifugation at 2000 rev min^{-1} for 10 min and stored at −80°C until assay. Plasma PGE_2 levels were determined with an immunoassay kit according to the manufacturer's procedure (Cascade Biochem Limited, Bershire, UK).

Ex vivo *study*

All volunteers received randomly in a cross-over design 7.5 mg meloxicam (Mobic®, Bœhringer Ingelheim, Paris, France) once for 5 days, 400 mg ibuprofen (Brufen®, Knoll, Levallois-Perret, France) three times daily for 3 days or 75 mg of diclofenac SR (Voltarène®, Novartis, Rueil-Malmaison, France) once for 3 days. Drug regimens, corresponding to half of the maximal recommended dosages [18–20], were chosen to mimic the clinical practice even if lower doses of NSAIDs would probably have help to define more precisely their *in vivo* selectivity. Study duration was about 24 weeks and treatments were separated by adapted wash-out periods of minus 7 days after meloxicam and 2 days after ibuprofen or diclofenac.

Intake of meloxicam or diclofenac was at 08.30 h and intake of ibuprofen was at 09.00 h, noon and 20.00 h with a light meal. Drug intake was controlled by ~~tel~~phone and absence of occult intake of NSAID was confirmed by chromatographic analysis as described below. Peripheral venous blood samples were drawn before any drug administration and after a single or a repeated intake of NSAID. Sampling times allowed each NSAID to enter the circulation importantly [18–20]: 5.5 h after meloxicam, 2.5 h after ibuprofen and 3.5 h after diclofenac. Samples were assessed for TXB_2 and PGE_2 production in whole blood, as described above, and relative changes after drug intake were expressed as percentage of predose levels. Blood samples were also used for the determination of NSAIDs concentration in plasma.

C-reactive protein and creatinine serum levels, liver function tests, platelets and blood cells counts were controlled throughout the study.

Plasma drug concentrations

Total plasma concentrations of meloxicam, diclofenac and racemic ibuprofen were determined by high-performance liquid chromatography (h.p.l.c.) as described elsewhere with minor modifications [21]. The h.p.l.c. system consisted of a Model 510 pump, a Model 486 variable wavelength u.v. detector and a computer loaded with the Millenium software, all from Waters Associates (St Quentin en Yvelines, France). Briefly, plasma or serum samples (200 μl) were added with 1 μg of (benzoyl-4-phenyl)-2-butyric acid (Specia, Vitry, France) as internal standard, then extracted with diethyl ether (3 ml) after acidification with 1 M hydrochloric acid (0.1 ml). After evaporation under a nitrogen stream, the dry residues were dissolved in 100 μl of the mobile phase (acetonitrile-0.3% acetic acid [50:50, v/v]) and chromatographed isocratically in the following conditions: 100 × 8 mm internal diameter reversed-phase Radial Pak C_{18} end-capped column enclosed in a RCM-10 compression module (Waters), 1 ml min^{-1} of flow rate, peak detection at 230 nm for diclofenac, 280 nm for ibuprofen and 360 nm for meloxicam.

In the case of ibuprofen, *R*- and *S*-enantiomers were evaluated using the same methodology with the following modifications. The dry residues were derivatized, as described previously for ketoprofen [22] by adding 100 μl

J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:08:00 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

of 50 mM triethylamine in acetonitrile, then 50 μl of 60 mM ethyl chloroformate (Merck) in acetonitrile for 30 s followed by 50 μl of 1 M L-leucinamide in 1 M triethylamine in methanol for 2 min at room temperature. The reaction was stopped by addition of 50 μl distilled water. Derivatized samples were then eluted isocratically using the following mobile phase (Na_2HPO_4 50 mM-acetonitrile-triethylamine [58 : 42 : 0.02, v/v], where pH was adjusted at 7.0 with orthophosphoric acid) and enantiomers were detected at 223 nm.

The total plasma concentration of NSAIDs was determined both in the *ex vivo* and the *in vitro* study. For the later, the chromatographic measurement of drugs added exogenously served to assess the ability of NSAIDs to partition in blood cells. Due to the limits of detection of the chromatographic method, plasma NSAIDs concentrations were detected over 10^{-6} M only and the mean correcting factor calculated on the three highest doses was subsequently applied to the entire concentration range. If NSAIDs did not enter into red cells, the following dividing factor [100/(100−haematocrit)] had to be used for transforming whole blood into plasma concentrations.

Protein binding

Unbound fractions of NSAIDs were determined by equilibrium dialysis with subsequent h.p.l.c. analysis. Equilibrium dialysis was performed on a Dianorm apparatus (Braun ScienceTec, Les Ulis, France), equipped with 1 ml cells and Spectrapor 2 membranes (cut-off 12–14 kDa), at 37°C in a thermostat-controlled bath. Samples (1 ml) were dialysed for 3 h against 1 ml of 67 mmol l^{-1} phosphate buffer pH 7, a time sufficient to reach equilibration for each NSAID. Samples collected *ex vivo* after ibuprofen intake and samples added *in vitro* with NSAIDs were analysed after a subsequent addition of 20 μg ml^{-1} of either diclofenac, meloxicam or racemic ibuprofen.

Statistical analysis

Data were expressed as mean ± s.d. or s.e. mean when specified. Inhibition of whole blood TXB_2 and PGE_2 production by NSAIDs was calculated as the percentage of baseline levels in the same patient. The inhibition of COXs was modelled using the following equation mathematically analogous to the Hill function: $Y = [a - d/(1 + (X/c)^b] + d$, where X and Y represent the molar concentration of NSAID and the percentage of inhibition, respectively; a, b, c and d are the parameters of the equation [23]. Fitting of the experimental data to this model was carried out by minimization of the objective function, defined as the sum of square deviations between predicted and experimental response. The best fit was with a weight at 1/Y. This equation was used to fit the sigmoidal concentration-response curves and to estimate the IC_{50} and IC_{80} values from the values of the parameters. Fitting was made with all drugs, both for each patient and for mean curves, allowing to calculate individual and mean ICs for COX-1 and COX-2.

Having excluded a sequence or carry-over effects by a multivariate ANOVA, the *ex vivo* whole blood data were combined regardless of the treatment sequence. For each NSAID, statistical comparisons (plasma drug concentration, COX inhibition) between single and repeated intake were done using the Student's paired *t*-test. The statistical level of significance was chosen at 5%.

Based on the individual fitting of COXs inhibition in whole blood and the determination of a plasma-to-whole blood correcting factor for each NSAID, *in vitro* sigmoidal concentration-response curves were reconstructed for plasma NSAIDs concentration. Using these plasma concentration-COXs inhibition curves and the circulating levels of NSAIDs measured after single and repeated intake, we determined the theoretical levels of COX-1 and COX-2 inhibition. These theoretical levels of COXs inhibition were calculated on individual and mean concentration-response curves. Their comparison with the level of COX inhibition really observed *ex-vivo* was performed using the 95% confidence interval of the centred relative difference [(theoretical−observed)/observed] to the interval [−0.25, +0.25] chosen for statistical significance.

Results

In vitro *study*

Plasma PGE_2 and serum TXB_2 averaged 77.2 ± 28.4 ng ml^{-1} (mean ± s.d., $n = 24$) and 391.2 ± 152.6 ng ml^{-1}, respectively, at baseline. Intra-subject coefficients of variation, determined on three different measurements of basal COX activities (before each treatment phase of the clinical study), averaged 18 ± 13% for PGE_2 and 26 ± 18% for TXB_2. The mean IC_{50} values for COX-1 and COX-2 calculated from the individual dose–response curves (individual IC_{50}) showed that ibuprofen inhibited COX-1 more efficiently than COX-2 (IC_{50}COX-2/COX-1 = 3.3) whereas diclofenac and meloxicam inhibited COX-2 with a higher potency than COX-1 (IC_{50}COX-2/COX-1 = 0.16 and 0.23, respectively) (Table 1). Similar data were obtained from the mean dose–response curves showing IC_{50}COX-2/COX-1 ratios of 2.3 for ibuprofen, 0.16 for diclofenac and 0.19 for meloxicam. In all case, diclofenac was approximately one order of magnitude more potent than meloxicam for inhibiting COX activities (6–7-fold on COX-1 and 8–10-fold on COX-2). The overall COX selectivity of NSAIDs was unchanged when considering the IC_{80}s

© 2002 Blackwell Science Ltd

J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:08:01 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

ratios, although diclofenac appeared slightly more selective for COX-2 than meloxicam in this case (Table 1).

Ex vivo *study*

Tolerability of the medications

The 24 volunteers completed the study in accordance with the study protocol. Neither serious nor minor adverse events were observed or reported. Liver function tests, serum creatinine and C-reactive protein levels (<5 mg l^{-1}), haematocrit, platelet and blood cell counts did not vary significantly over study duration.

Plasma concentration of NSAIDs

Measurement of plasma drug concentrations after a single and a repeated intake are shown in Table 2. Drug monitoring confirmed the good compliance of the patients (only four abnormally low NSAIDs concentrations over 144 assays) and the lack of any occult intake of NSAID over study duration. Plasma drug concentrations were similar after a single and a repeated oral intake for both ibuprofen and diclofenac while a 1.8-fold increase in plasma concentration was noted for meloxicam at steady state ($P<0.05$).

Inhibition of COXs activity

The relative changes of prostanoid formation after NSAID intake are shown in Table 3. Ibuprofen inhibited almost completely COX-1 activity after a single and a repeated intake whereas COX-2 inhibition averaged 80% at corresponding times. Diclofenac reduced COX-1 activity by about 70% and COX-2 by about 96% whatever treatment duration. In contrast, a significant increase ($P<0.05$) in COX inhibition was observed after a repeated intake of meloxicam, which was more marked on COX-1

Table 1 *In vitro* potencies of diclofenac, ibuprofen and meloxicam to inhibit the synthesis of prostanoid by human whole blood COX isoenzymes. Data are expressed as concentration inhibiting COX activity by 50% [IC_{50}] or 80% [IC_{80}].

	COX-1		*COX-2*		*Ratios*		*COX-1*		*COX-2*		*Ratios*	
	IC_{50}[a]	IC_{80}[a]	IC_{50}[a]	IC_{80}[a]	COX-2/COX-1[a]		IC_{50}[b]	IC_{80}[b]	IC_{50}[b]	IC_{80}[b]	COX-2/COX-1[b]	
NSAID	*(μM)*	*(μM)*	*(μM)*	*(μM)*	IC_{50}	IC_{80}	*(μM)*	*(μM)*	*(μM)*	*(μM)*	IC_{50}	IC_{80}
Diclofenac	0.35±0.26	1.32±0.10	0.06±0.05	~~1.33±1.31~~	*0.17*	*0.10*	0.25	1.17	0.04	0.16	*0.16*	*0.13*
Ibuprofen	6.05±4.82	27.0±15.90	19.90±24.01	221.0±710.0	*3.29*	*8.19*	4.30	40.80	10.00	74.90	*2.33*	*1.84*
Meloxicam	2.64±2.49	8.92±8.68	0.60±0.82	2.51±2.04	*0.23*	*0.28*	1.60	12.30	0.31	4.16	*0.19*	*0.34*

[a]Data obtained by the arithmetic mean ± s.d. of individual IC_{50} or IC_{80} values. [b]Data obtained from the mean concentration response curves.

Table 2 Monitoring of plasma NSAIDs concentrations after oral intake of 75 mg day^{-1} of diclofenac SR, 400 mg three times daily of ibuprofen and 7.5 mg day^{-1} of meloxicam. H.p.l.c. analysis was done as described in the method section. Concentration was determined 3.5 h after diclofenac, 2.5 h after ibuprofen and 5.5 h after meloxicam intake and steady-state was evaluated after 3 days of diclofenac, 2 days of ibuprofen and 5 days of meloxicam. Data are expressed as mean ± s.d. of 24 volunteers.

Diclofenac (μg ml^{-1}) ([μM])		*Ibuprofen (μg ml^{-1}) ([μM])*		*Meloxicam (μg ml^{-1}) ([μM])*	
Single	*Repeated*	*Single*	*Repeated*	*Single*	*Repeated*
0.38±0.35	0.27±0.18	24.0±8.0	14.8±5.9	0.62±0.13	1.09±0.37*
(1.19±1.10)	(0.85±0.57)	(116.2±38.7)	(70.4±1.28)	(1.76±0.37)	(3.11±1.06)*

*$P<0.05$ *vs* single intake.

Table 3 *Ex vivo* inhibition of prostanoid formation in whole blood after single and repeated oral intake of diclofenac, ibuprofen or meloxicam. Results are expressed as percentage of inhibition of TXB_2 production, as a reflect of platelet COX-1, and PGE_2 production, as a reflect of monocyte COX-2, relative to the predose values.

	COX-1 inhibition (%)		*COX-2 inhibition (%)*	
NSAID (dose)	*Single*	*Repeated*	*Single*	*Repeated*
Diclofenac (75 mg day^{-1})	69±22	71±18	95±16	97±5
Ibuprofen (400 mg three times daily)	96±3	90±16	83±12	76±20
Meloxicam (7.5 mg day^{-1})	30±16	55±20*	63±16	83±13*

All values are mean ± s.d.; *$P<0.05$ *vs* single.

J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:08:01 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

(1.8-fold change) than on COX-2 (1.3-fold change). It is worth noting that four subjects in the meloxicam phase of the study failed to show any detectable inhibition of prostanoid synthesis, despite drug plasma levels in the therapeutic range. This explains, as least in part, the higher scattering of values observed with meloxicam than with other NSAIDs, especially for COX-1 inhibition.

In vivo *relevance of* in vitro *data*

Transformation of whole blood into plasma drug concentration
Haematocrit averaged $0.44 \pm 0.02\ l\ l^{-1}$ throughout study duration and the corresponding dividing factor was 1.81 ± 0.07 for the transformation of whole blood into plasma concentrations. The comparison between the expected whole blood concentration of NSAIDs and the concentration really measured by h.p.l.c. in plasma showed that the correcting factor averaged 1.65 ± 0.24 for ibuprofen, 1.34 ± 0.20 for diclofenac and 1.49 ± 0.13 for meloxicam. Thus, the transformation of whole blood into plasma concentrations differed slightly between NSAIDs and was not fitted adequately when considering haematocrit only. These data suggested that NSAIDs entered, at least in part, into whole blood cells.

Overall predicting value of the in vitro *assay*
The mean dose–response curves reconstructed by considering the plasma concentration of NSAIDs measured *in vitro* are depicted in Figure 1(a,b,c). When considering the plasma concentrations measured after single and repeated drug intake, the expected (theoretical) levels of COX inhibition were quite similar if they were calculated from the individual or the mean concentration-response curves (data not shown). However, when these theoretical levels were matched to those measured after NSAID intake, a larger than expected scattering of experimental

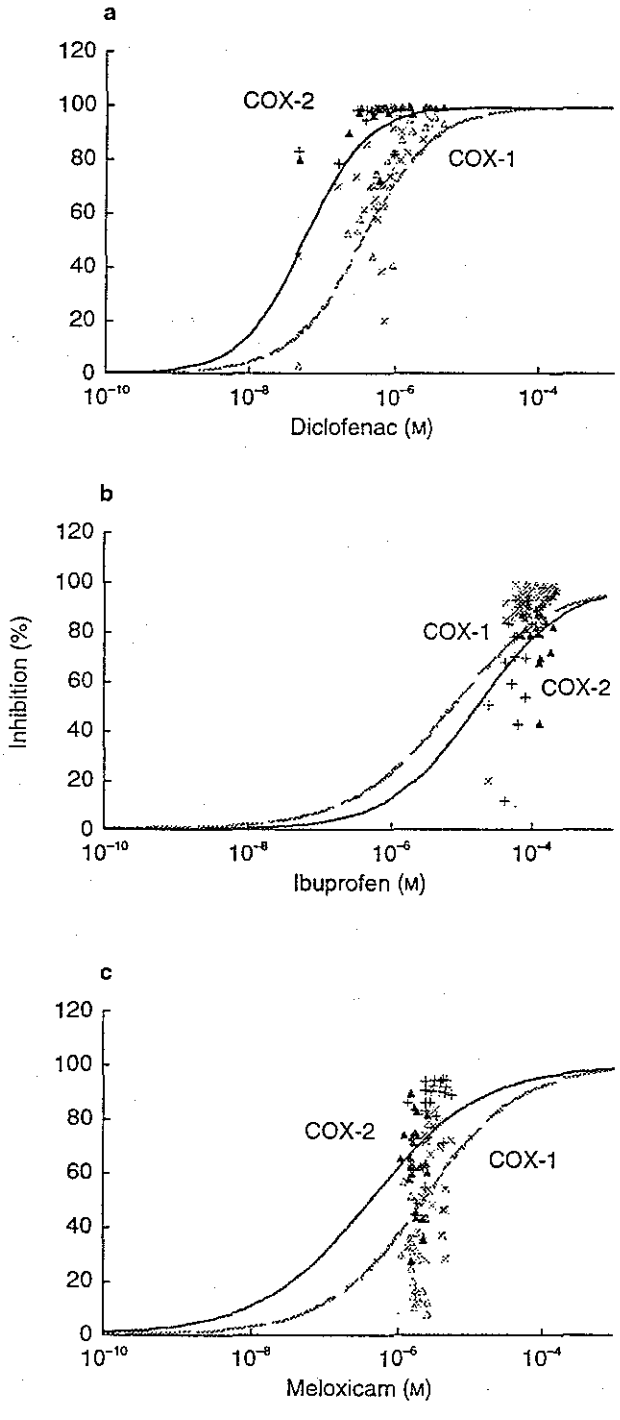


Figure 1 Comparison of NSAID concentrations and inhibition of COX activities in human blood assessed *in vitro* and *ex vivo*. The *in vitro* dose–response curves of platelet COX-1 (grey hatched line) and monocyte COX-2 (black line) activities were done for diclofenac (a), ibuprofen (b) and meloxicam (c). Increasing concentrations of NSAIDs were incubated with 1 ml whole blood samples allowed to clot for 1 h, and serum TXB_2 levels were measured as a reflection of thrombin-induced platelet thromboxane A_2 production. NSAIDs were also incubated with 1 ml heparinized whole blood samples in the presence of aspirin ($10\ \mu g\ ml^{-1}$) and LPS ($10\ \mu g\ ml^{-1}$) for 24 h, and plasma PGE_2 levels were assayed as a reflection of endotoxin-induced monocyte COX-2 activity. *In vitro* whole blood concentrations of NSAIDs were corrected into plasma concentrations using a dividing factor of 1.34 for diclofenac, 1.65 for ibuprofen and 1.49 for meloxicam. Results, depicted as percentage inhibition, were obtained from triplicates of the 24 volunteers and concentration-response curves were fitted according to the Hill function as described in the method section. In the *ex vivo* study, plasma NSAIDs concentrations measured after single and repeated intake of diclofenac ~~100~~ 75 mg once, ibuprofen 400 mg three times daily or meloxicam 7.5 mg once were plotted on the same graph *vs* the percentage of inhibition of COX-1 (△: single; ×: repeated) and COX-2 (▲: single; +: repeated) activities measured *ex vivo* at the same time.

© 2002 Blackwell Science Ltd

J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:08:02 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

data was observed (Figure 1a,b,c). The *in vivo* inhibitory potency of diclofenac was predicted by the *in vitro* assay: [−0.18, 0.21] for COX-1 and [−0.13, −0.03] for COX-2. For ibuprofen, the *in vitro* assay was relevant for COX-1 [−0.18, 0.03] but not for COX-2 [−0.14, 0.27] whereas it was relevant for COX-2 ([−0.05, 0.15]) but not for COX-1 ([0.31, 1.05]) in the case of meloxicam. When existing, the predicting value of the *in vitro* assay was better for a repeated intake than for a single intake of diclofenac ([−0.10, −0.02] *vs* [−0.19, −0.01] for COX-2, respectively) or meloxicam ([−0.15, −0.01] *vs* [−0.01, 0.35] for COX-2, respectively), whereas the contrary was observed for ibuprofen ([−0.24, 0.18] *vs* [−0.13, −0.10] for COX-1, respectively) (Figure 1). These data were consistent both with the lowest scattering of plasma concentrations of diclofenac and ibuprofen at corresponding times and with the significant increase in circulating meloxicam between single and repeated intake (Table 2).

Influence of protein binding on the predicting value of the in vitro *assay*

The unbound fraction mirrored the total concentration of NSAIDs, since the concentrations of free diclofenac or ibuprofen were similar after single and repeated intake whereas this of free meloxicam increased with the repetition of the dose (data not shown). In the case of ibuprofen, the unbound fraction was identical *in vitro* ($0.27 \pm 0.07\%$) and *in vivo* ($0.23 \pm 0.07\%$ after a single intake, $0.22 \pm 0.08\%$ after a repeated intake), highlighting that circulating metabolites did not contribute to protein binding. When the predicting value of the *in vitro* assay was tested using the free concentration of NSAIDs, the data were similar to those obtained with the total concentration of drugs: (i) predictability was achieved in the [−0.25, +0.25] interval except for meloxicam on COX-1 (Figure 2) and ibuprofen on COX-2 (Figure 3); (ii) predictability was at best after a repeated intake of diclofenac or meloxicam but a single intake of ibuprofen.

Influence of stereoselectivity on the predicting value of the in vitro *assay*

As the drug added *in vitro* to donated blood samples was ibuprofen racemate, the dose–response curves were easily refitted by considering *S*-(+)-enantiomer as half of the concentration applied (Figure 4). *In vivo*, the ratio of *S*-(+)/*R*-(−) ibuprofen enantiomers varied between individuals (range [0.87–3.89]) and increased from 1.45 ± 0.41 (mean ± s.d.) after a single intake to 2.18 ± 1.03 after a repeated intake. When considering the plasma levels of the *S*-(+)-enantiomer only, the *in vitro* whole blood assay was predictive of the *in vivo* COX inhibition after a single intake of ibuprofen ([−0.12, −0.10] for COX-1, [−0.12, 0.07] for COX-2). After a repeated drug intake, the inhibitory potency was estimated adequately on COX-1 ([−0.22, 0.21]) but not on COX-2 ([−0.25, 0.68]) (Figure 4). Similar data were obtained when considering the unbound fraction of the *S*-(+)-enantiomer (data not shown), demonstrating that this limitation was not supported by a variable stereoselective protein binding.

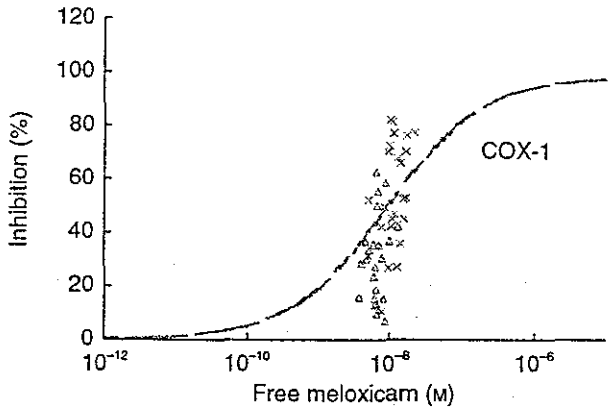


Figure 2 Discrepancy between inhibition of platelet COX-1 activity by free meloxicam *in vitro* and percentage of COX-1 inhibition observed *ex vivo* after an oral intake of 7.5 mg day^{-1} (△: single intake; ×: repeated intake).

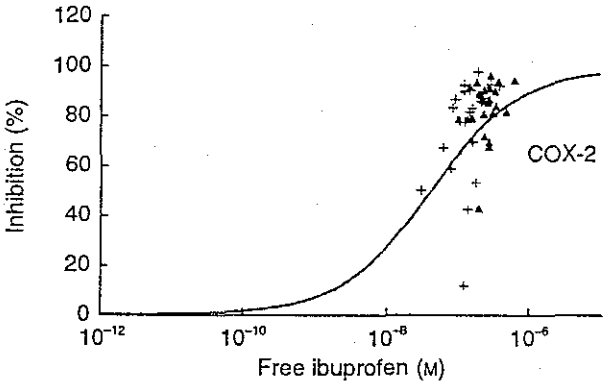


Figure 3 Discrepancy between inhibition of monocyte COX-2 activity by free ibuprofen racemate *in vitro* and percentage of COX-2 inhibition observed *ex vivo* after an oral intake of 400 mg three times daily (▲: single intake; +: repeated intake).

Discussion

The present work investigated if the COX inhibitory potency of NSAIDs determined with the *in vitro* whole blood assay was relevant for clinical practice. The rationale was that the whole blood system is unique for comparing *in vitro* and *in vivo* data in the same subject [10, 12, 14], and is often considered as a reference system for establishing the selectivity of NSAIDs towards COX isoenzymes [11, 13]. The clinical relevance of any *in vitro* assay is of

© 2002 Blackwell Science Ltd

J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:08:03 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

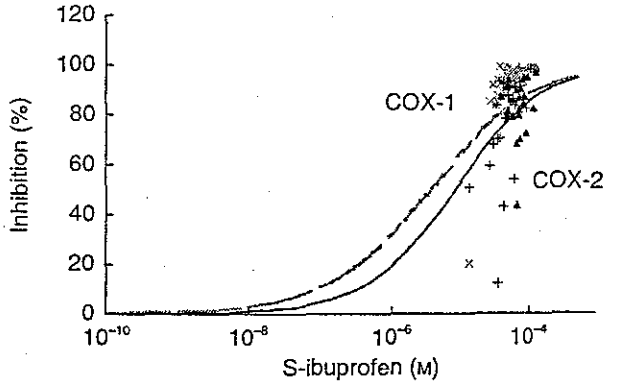


Figure 4 Influence of enantioselectivity on the inhibitory potency of ibuprofen towards COX activities in human blood assessed *in vitro* and *ex vivo*. The *in vitro* dose–response curves of platelet COX-1 (grey hatched line) and monocyte COX-2 (black line) activities were done considering that the *S*-(+)-enantiomer represented half of the racemate concentration. Results, depicted as percentage inhibition, were obtained from triplicates of the 24 volunteers and concentration–response curves were fitted according to the Hill function as described in the method section. In the *ex vivo* study, plasma concentrations of *S*-(+)-ibuprofen measured after a single and a repeated intake of 400 mg three times daily of ibuprofen racemate were plotted on the same graph *vs* the percentage of inhibition of COX-1 (△: single; ×: repeated) and COX-2 (▲: single; +: repeated) activities measured *ex vivo* at the same time.

primary importance since efforts were made to evidence a link between the COX selectivity ratio of NSAIDs and their ability to produce severe gastro-intestinal complications [13, 24], a meaning supported further by the low incidence of clinically important upper gastrointestinal events with 'selective COX-2 inhibitors' [25, 26]. As all *in vitro* systems, the whole blood assay is limited by its relevance to the level of COX inhibition in target tissues, i.e. inflamed joints and gastric mucosa, but offers advantage of investigating biochemical selectivity *ex vivo* at therapeutic plasma levels of NSAIDs [14, 27].

In our experimental conditions, we pointed out that the level of COX-1 and COX-2 inhibition achieved *in vivo* can not be predicted universally from corresponding *in vitro* dose–response curves. Indeed, the predictability of the whole blood assay was suitable for diclofenac, acceptable for ibuprofen, although with some limitations relative to COX-2 inhibition, but unadapted to meloxicam. As we did not study range doses of each NSAID, we cannot rule out that the predictability of the system would be influenced by drug dosage, since a variable selectivity profile could have appeared at lower doses of NSAIDs. Consistent with this are both the quite complete inhibition of COX-1 by ibuprofen and COX-2 by diclofenac from the first drug intake and the well known dose-dependent inhibition of COX isoenzymes by NSAIDs [16, 27]. This quite unexpected finding was favoured by our choice of sampling blood at a time consistent with a high plasma concentration of drugs, since COX inhibition follows the pharmacokinetics of NSAIDs [16, 28]. However, one must underline that clinical trials demonstrated an equivalent efficacy of daily doses of 7.5 mg of meloxicam and 100 mg of diclofenac in osteoarthritis [18], whereas the time for blood sampling was shown as critical for interpreting the inhibitory potency of meloxicam on platelet functions [16, 17, 27]. As the limitation of the *in vitro* whole blood assay was observed mainly with meloxicam, whose lower doses are ineffective [18], we think that our study protocol allowed a convenient though no exhaustive analysis of the clinical relevance of the system. Furthermore, the plasma concentration of drugs were 28–40-fold higher for diclofenac, 8–14-fold higher for meloxicam, and 12–19-fold higher for ibuprofen than their corresponding *in vitro* IC_{50} on COX-2, confirming that the doses could be assumed to have at least an equal anti-inflammatory efficacy.

In an effort to explain the variable predictability of the whole blood system, we searched for possible causes related to the biological system itself. As our *in vitro* IC_{50} COX-2/COX-1 ratios were close to those reported with the same methodology [12, 13, 27], such limitation is unlikely to result from our experimental conditions. However, the intrasubject variation reached 26%/18% for COX-1 and 18%/13% for COX-2, whereas the intersubject variation reached 39% for COX-1 and 36% for COX-2. These results are in good accordance with previous clinical studies [12, 16, 27, 28], but confirms that biological variability is a possible limitation of the whole blood assay [11] since scattering in baseline levels of prostanoids may exceed this of purified enzymes or cell-based assays [4, 5, 10]. Furthermore, this intersubject variation makes hazardous to study the inhibitory potency of NSAIDs in a small number of patients and to extrapolate the individual level of COX inhibition from the dose–response curve of foreign patients. As the number of patients used for establishing the dose–response curves of NSAIDs varied from 5 [10] to 20 [29], the comparison of published selectivity ratios could be disturbed by the variability of the system, even if we failed to improve its clinical relevance when considering individual instead of mean dose–response curves. Since each of our 24 subjects balanced the mean dose–response with the same weight, this finding was not unexpected although it highlighted that the predicting value of the whole blood system remained limited even when the intersubject variation was taken into account.

Estimation of the *in vivo* extent of COX inhibition from the plasma concentration of NSAIDs is based generally on the prerequisite that drugs do not enter red cells and that haematocrit is 45% [10, 12]. Unfortunately, we demonstrated that the drugs partitioned differently into whole

© 2002 Blackwell Science Ltd

J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:08:04 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

cells, although the difference remained moderate between molecules since they were acidic in nature. The factor accounting for the transformation of whole blood into plasma concentrations followed a different rank order from the drug pKa, suggesting that it was influenced by the lipophilicity of the molecules. Despite having a limited influence for interpreting data with classical NSAIDs, we suggest that it could be a major flaw to neglect the ability of non acidic molecules to enter red cells since, for example, celecoxib is thought to be evenly distributed between erythrocytes and plasma [30]. In addition, the use of a normalized haematocrit has no influence as long as the studies are made in healthy subjects of the same sex, but it adds further limitation to the predicting value of the whole blood system in patients with chronic inflammation.

From a pharmacokinetic point of view, inhibition of COX isoenzymes by NSAIDs may differ between *in vitro* and *in vivo* conditions because drugs can accumulate in the target cells, can be degraded variably between individuals or may act through metabolites [10, 12]. We demonstrated that diclofenac exhibited a higher COX-2 selectivity than meloxicam *in vitro* although it inhibited COX-1 more efficiently than meloxicam after single and repeated oral intake. As their metabolites are inactive [18, 20], such discrepancy cannot be explained by a slower metabolism of meloxicam than of diclofenac in liver. A more likely explanation is that, when drugs were administered at half the maximal recommended doses, the plasma concentration of diclofenac exceeded its inhibitory potency on COX isoenzymes more largely than this of meloxicam, as we discussed before. As meloxicam 7.5 mg day^{-1} was as effective as a higher dose of diclofenac in clinical studies [18], this finding challenges further the exclusive contribution of COX inhibition in the therapeutic effects of some NSAIDs. Besides, Panara and coworkers reported that the 35% inhibition of platelet COX-1 activity by 15 mg day^{-1} of meloxicam corresponded to a 70% inhibition of monocyte COX-2 activity at steady-state [27], which confirms that oral doses of meloxicam were not excessive in terms of COX inhibition. For ibuprofen, we investigated the contribution of the *S*-(+)-enantiomer because it is several order of magnitude more potent than the *R*-(−)-enantiomer in inhibiting prostaglandin synthesis *in vitro* [31] and can be generated *in vivo* by enantiomeric inversion via the formation of coenzyme A thioesters [32]. We showed that the *S*-(+)/*R*-(−) ratio was highly variable at a given time and increased with repetition of the dose in the same subject. Although this ratio is not an ideal index of fractional inversion, as it depends also on protein binding, one must underline that the predicting value of the *in vitro* assay on COX-2 was not changed when considering the *S*-(+)-enantiomer only. As the weakest predictability was observed at steady-state, that is when the *S*-(+)/*R*-(−) ratio was the highest, it is tempting to speculate that the higher than expected inhibition of COX-2 could be supported by the additional contribution of the *R*-ibuprofenoyl-CoA thioester [33].

Protein binding is another key limiting factor of the pharmacokinetics of NSAIDs which is thought to be accurately reproduced by the *in vitro* whole blood assay [10, 12]. As NSAIDs are highly bound to albumin, we searched for intersubject variability in protein binding as a possible limitation of the system. We demonstrated that the inability of the whole blood assay to predict the inhibitory potency of meloxicam on COX-1 cannot be ascribed to an abnormal protein binding. This appears logical when considering that unbound fraction of NSAIDs is a faithful reflection of their total concentration in healthy volunteers, that protein binding of meloxicam is linear in its therapeutic range [18], and that any occult of NSAID was excluded by a careful plasma monitoring. For ibuprofen, the measurement of free drug concentration was of particular interest since protein binding can vary from linear to non linear depending on the dose and includes a stereoselective competition for albumin sites [19]. The concentration of free *S*-(+)-ibuprofen, the less protein bound enantiomer [32], varied differently from those of unbound racemate, with a higher proportion of the *S*-enantiomer after a repeated (81%) than after a single intake (72%). This finding agreed well with the concomitant increase in the *S*-(+)/*R*-(−) ratio suggesting that it was reflecting the chiral inversion rather than the enantiomeric protein binding. However, despite this relative increase in the unbound active fraction, the *in vitro* system still underestimated the inhibitory potency of ibuprofen on COX-2 at steady state. Thus, our data are consistent with the possible contribution of additional metabolites to the *in vivo* COX-2 inhibitory potency of ibuprofen.

The inability of the whole blood assay to estimate the inhibitory potency of meloxicam on COX-1 needs further discussion. It is noticeable that inhibition of COX-1 by meloxicam showed the highest scattering of values, with coefficients of variation averaging 53% after single and 36% after repeated drug intake. This variability was unexpected since it contrasted with the homogeneity of *ex vivo* COX-2 inhibition and plasma concentration of meloxicam. Surprisingly, the increase in plasma concentration of meloxicam with repetition of the dose paralleled its inhibitory potency on COX-1 (1.8-fold increase) but not on COX-2 (1.3-fold increase). A similar dissociation between circulating drug levels and COX inhibition was reported after a repeated intake of increasing doses of meloxicam, although both COX iso-enzymes were affected similarly [27]. Interestingly, a possible cumulative inhibition of COX-1 was suggested to explain the higher than expected inhibition of platelet activity [27]. In contrast, an adaptation of platelet COX-1 was proposed to

© 2002 Blackwell Science Ltd

J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:08:04 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

explain the lower inhibition of COX-1 by meloxicam at steady-state than it could be expected from its level of inhibition after a single dose [16]. Our results support none of these proposals since inhibition of COX-1 followed the plasma concentration of meloxicam between single and repeated intake. We suggest that the inability of the whole blood assay to estimate COX-1 inhibition by meloxicam was partly attributable to the lack of inhibition observed in some subjects despite drug plasma concentrations in the therapeutic range. Although it remains unexplained, this finding contributes likely to scattering of values in the most critical, i.e. the linear, part of the sigmoidal dose–response curve. The variable influence of plasma concentration of meloxicam on COX-1 and COX-2 activity may reflect a higher drug accumulation in monocytes than in platelets. Alternatively, a different mechanism of inhibition of COX iso-enzymes by meloxicam cannot be excluded [34], since we did not performed recovery experiments.

Conclusions

The present cross-over study revisited the clinical relevance of the whole blood assay through comparing the COX inhibitory potency of NSAIDs *in vitro* and *in vivo* in the same subjects. We confirmed that the biological variability of the system was high, although this does exceed its advantages as long as a sufficient (high) number of subjects is considered. We showed further that the selectivity ratios obtained *in vitro* using IC_{50}s gave a somewhat misleading view of the selectivity of NSAIDs in clinical use, with diclofenac and meloxicam being more COX-2 selective *in vitro* than *in vivo*. In addition, the *in vitro* whole blood assay estimated adequately the *ex vivo* inhibition of COXs iso-enzymes by diclofenac but was not adapted to this of meloxicam on COX-1 and ibuprofen on COX-2, even when considering variability due to protein binding or chiral inversion. These data extent previous work with the whole blood assay [14, 16, 27] to underline the limitations of assessing COX-2 selectivity based on *in vitro* studies and pharmacological modelling, even with a 'more physiological' system. We conclude that there a need to investigate COX selectivity at therapeutic plasma concentrations of NSAIDs, as assessed *ex vivo* with the same assays.

The authors will to thank Françoise Groussin for her excellent technical assistance and Pr Pierre Gillet for his helpful comments on the manuscript.

This work was supported by grant n°971016 from the 'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé' of the French Minister for Health.

References

1 Vane JR. Inhibition of prostaglandins as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol* 1971; **231**: 232–235.
2 Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van de Putte L, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; **12**: 1063–1073.
3 Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; **38**: 97–120.
4 Meade EA, Smith WL, DeWitt DL. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal anti inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1993; **268**: 6610–6614.
5 Battistini B, Botting R, Bakhle YS. Cox-1 and Cox-2: Towards the development of more selective NSAIDs. *Drug News Perspectives* 1994; **7**: 501–512.
6 Vane JR. Towards a better aspirin. *Nature* 1994; **367**: 215–216.
7 Jouzeau J-Y, Terlain B, Abid A, Nédélec E, Netter P. Cyclooxygenase isoenzymes: how recent findings affect thinking about non steroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs* 1997; **53**: 563–582.
8 Frölich JC. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* 1997; **18**: 30–34.
9 Griswold DE, Adams JL. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev* 1996; **16**: 181–206.
10 Pairet M. Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. Analysis of the in vitro test systems and their clinical relevance. *J Clin Rheumatol* 1998; **4**: S17–S25.
11 Lipsky PE, Abramson SB, Crofford L, DuBois RN, Simon L, Van de Putte LBA. The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J Rheumatol* 1998; **25**: 2298–2303.
12 Patrignani P, Panara MR, Sciulli MG, Santini G, Renda G, Patrono C. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* 1997; **48**: 623–631.
13 Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drugs selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7563–7568.
14 Panara MR, Padovano R, Sciulli MG, Santini G, Renda G, *et al.* Effects of nimesulide on constitutive and inducible prostanoid biosynthesis in man. *Clin Pharmacol Ther* 1998; **63**: 672–681.
15 Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998; **104**: 413–421.
16 Tegeder I, Lötsch J, Krebs S, Muth-Selbach U, Brune K, Geisslinger G. Comparison of inhibitory effects of meloxicam and diclofenac on human thromboxane biosynthesis after single doses and at steady state. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **65**: 533–544.
17 Stichtenoth DO, Wagner B, Frölich JC. Effects of meloxicam and indomethacin on cyclooxygenase pathways in healthy volunteers. *J Invest Med* 1997; **45**: 44–49.
18 Degner F, Türck D, Pairet M. Meloxicam. Pharmacological, pharmacokinetic and clinical profile. *Drugs of Today* 1998; **34**: (ASupplement,) 1–22.

© 2002 Blackwell Science Ltd

J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:08:05 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

19 Davies NM. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34: 101–154.

20 Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. *Clin Pharmacokinet* 1997; 33: 184–213.

21 Lapicque F, Netter P, Bannwarth B, Trechot P, Gillet P, *et al.* Identification and simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs using high performance liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Applic* 1989; 496: 301–320.

22 Presle N, Lapicque F, Gillet P, Hermann MA, Bannwarth B, Netter P. Effect of dimethicone (polysilane gel) on stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54: 351–354.

23 De Lean A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose–response curve. *Am J Physiol* 1978; 235: E97–E102.

24 Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 26: 2–10.

25 Bombardier C, Laine L, Reicin D, Shapiro D, Burgos-Vargas R, *et al.* Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1520–1528.

26 Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T *et al.* Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *JAMA* 2000; 284: 1247–1255.

27 Panara MR, Renda G, Sciulli MG, Santini G, Di Giamberardino M, *et al.* Dose-dependent inhibition of platelet cyclooxygenase-1 and monocyte cyclooxygenase-2 by meloxicam in healthy subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290: 276–280.

28 Patrono C, Ciabattoni G, Patrignani P, Pugliese F, Filabozzi P *et al.* Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition. *Circulation* 1985; 72: 1177–1184.

29 Cullen L, Kelly LO, Connor S, Fitzgerald DJ. Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 578–582.

30 Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38: 225–242.

31 Boneberg EM, Zou M-H, Ullrich V. Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by R(−) and S(+)-ibuprofen. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 16S–9S.

32 Evans AM. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the profens: enantioselectivity, clinical implications, and special reference to S(+)-ibuprofen. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 7S–15S.

33 Neupert W, Brugger R, Euchenhofer C, Brune K, Geisslinger G. Effects of ibuprofen enantiomers and its coenzyme A thioesters on human prostaglandin endoperoxide synthases. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 487–492.

34 Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K, Isakson PC. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem J* 1999; 339: 607–614.



J Clin Pharmacol 76316-27 12/12/01 12:08:05 Rev 6.05e/W (Mar 29 1999)
The Charlesworth Group, Huddersfield 01484 517077

Nom : **Monsieur BLAIN**
Prénom : **Hubert**

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en **BIOLOGIE SANTÉ ENVIRONNEMENT**

Spécialité : **SCIENCES DU MÉDICAMENT**

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 04 MARS 2002 n° 642

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1 — LE PRÉSIDENT

C. MERLET

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

RESUME

Une revue de la littérature montre que l'on ne sait pas si, en condition de prescription chez l'Homme, les pouvoirs inhibiteurs des anti–inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sur les iso–enzymes de la cyclooxygénase (COX), peuvent être prédits à partir des inhibitions mesurées *in vitro* en utilisant le sang comme source d'enzymes. C'est pourquoi nous avons comparé, dans une étude randomisée, croisée, le niveau d'inhibition des iso–enzymes de COX chez 24 hommes volontaires, âgés de 20 à 27 ans, *in vitro* avant toute prise d'AINS et *ex vivo* après prise unique ou répétée de 7,5 mg/j de meloxicam ou 400 mg x3 d'ibuprofène ou 75 mg de diclofénac LP. La production de thromboxane B2 (TxB_2) durant la coagulation spontanée et de prostaglandine E2 (PGE_2) après stimulation par 10µg de LPS ont servi d'indicateurs de l'activité COX–1 plaquettaire et COX–2 monocytaire respectivement. Le dosage plasmatique des AINS a été réalisé par HPLC, avec dosage stéréosélectif de l'ibuprofène et mesure des fractions libres après dialyse à l'équilibre. La variation intra–individuelle de l'activité basale de COX–1 et COX–2 était de 26 ± 18 % et 18 ± 13 % respectivement et la variation inter–individuelle de 39% et 36% respectivement. Les rapports d'IC_{50}s et d'IC_{80}s ont montré que le diclofénac et le meloxicam sont des inhibiteurs sélectifs de COX–2 et l'ibuprofène un inhibiteur préférentiel de COX–1 *in vitro*. Cependant, après prise orale d'ibuprofène, COX–2 est inhibée à 80 % *ex vivo* alors que le diclofénac inhibe COX–1 à 70 %. Le meloxicam inhibe COX–1 de 30 à 55 % en fonction de la répétition des prises et de l'augmentation des concentrations plasmatiques. En utilisant les courbes concentration–activité COX établies *in vitro*, le pouvoir inhibiteur du diclofénac *in vivo* a été estimé correctement à partir de sa concentration sanguine ([– 0,18;0,21] pour COX–1 et [– 0,13;– 0,03] pour COX–2), ce qui n'est pas le cas pour l'ibuprofene sur COX–2 ([– 0,14;0,27]) et le meloxicam sur COX–1 ([0.31;1.05]). La prédiction limitée du système n'a pas été améliorée en prenant en compte la fraction libre des médicaments et l'inversion chirale de l'ibuprofène. Nous en concluons que le profil de sélectivité d'un AINS mesuré *in vitro* ne peut être extrapolé aux conditions cliniques de prescription et que sa sélectivité pour les COXs doit être déterminée *ex vivo* aux concentrations thérapeutiques anti–inflammatoires.

In vitro and *ex vivo* assessment of inhibitory potency on cyclooxygenase iso–enzymes

A review of the literature shows that whether the inhibitory potency of nonsteroidal anti–inflammatory drugs on cyclooxygenase (COX) iso–enzymes, when given therapeutically in humans, can be predicted from their *in vitro* concentration–response curves using the whole blood assay is unknown. Therefore, we determined the inhibition of blood COX iso–enzymes in 24 healthy male volunteers aged 20 to 27 years, *in vitro* before any drug intake and *ex vivo* after single and repeated intake of either 7.5 mg meloxicam *once,* 400 mg ibuprofen *t.i.d* or 75 mg diclofenac SR *once,* taken in a randomized cross–over design. Production of thromboxane B2 (TxB_2) during clotting and of prostaglandin E2 (PGE_2) during endotoxin exposure served as indicators of platelet COX–1 and monocyte COX–2 activity respectively. Drug were determined in plasma by HPLC, with a chiral separation of ibuprofen and free fractions after equilibrium dialysis. Intra–subject variation for COX–1 and COX–2 at baseline was at 26 ± 18 % and 18 ± 13 % respectively and inter–subject variation at 39% and 36% respectively. The ratios of IC_{50}s and, at best, of IC_{80}s revealed diclofenac and meloxicam as selective COX–2 inhibitors and ibuprofen as a preferential COX–1 inhibitor *in vitro*. However, after oral intake, ibuprofen inhibited *ex vivo* COX–2 by 80 % whereas diclofenac inhibited COX–1 by 70 %. Meloxicam inhibited COX–1 from 30 to 55 % depending on the repetition of the dose and increase in plasma concentrations. Using *in vitro* dose–response curves, the *in vivo* inhibitory potency of diclofenac was estimated adequately from its circulating concentration ([– 0.18;0.21] for COX–1 and [– 0.13;– 0.03] for COX–2) but this was not the case for ibuprofen on COX–2 ([– 0.14;0.27]) and meloxicam on COX–1 ([0.31;1.05]). The limited predictability of the system was not improved through considering the unbound fraction of the drugs or the variable chiral inversion of ibuprofen. In conclusion, assessment of COX–2 selectivity based on *in vitro* studies and pharmacological modelling has a limited clinical relevance and investigation of COX selectivity at therapeutic plasma concentrations of NSAIDs using the *ex vivo* whole blood assay is required.

Mots–clés: Whole blood assay, NSAIDs, COX iso–enzymes, protein binding, enantioselectivity.

Département de Pharmacologie, UMR 7561CNRS–UHP, Faculté de Médecine de NANCY