

Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase

Jean-Yves JOUZEAU (1, 2), Mikaël DAOUPHARS (1), Alexandre BENANI (1), Patrick NETTER (1, 2)

(1) Laboratoire de Pharmacologie et UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine de Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy ;

(2) Service de Pharmacologie Clinique et Toxicologie, Hôpital central, CHU de Nancy, Nancy.

RÉSUMÉ

La découverte d'au moins deux iso-enzymes de la cyclooxygénase (COX) a eu deux conséquences majeures : i) la stimulation des recherches sur le métabolisme des lipides ayant conduit à la cristallisation de ces enzymes membranaires particulières, la caractérisation de leurs sites actifs et de leur régulation génique, et à l'identification de nouvelles voies de biotransformation ; ii) le développement de nouveaux AINS susceptibles d'avoir un index bénéfique/risque amélioré, les coxibs. Ces molécules se définissent par leur sélectivité d'inhibition de COX-2, c'est-à-dire par leur pouvoir inhibiteur négligeable sur la COX-1 plaquettaire *in vitro* et *ex vivo* après prise orale des posologies maximales recommandées. Les coxibs commercialisés en France (célecoxib, rofécoxib, parécoxib) ne sont cependant pas équivalents en termes de sélectivité et certaines molécules de "deuxième génération" (étoricoxib, lumiracoxib) seront encore plus sélectives de COX-2. Ces "nouveaux" coxibs correspondent au développement ultime de la notion de sélectivité pour COX-2 et permettront probablement d'appréhender les limites du concept thérapeutique basé sur l'inhibition sélective de cette iso-enzyme.

SUMMARY

Pharmacology and classification of cyclooxygenase inhibitors

Jean-Yves JOUZEAU, Mikaël DAOUPHARS, Alexandre BENANI, Patrick NETTER

(Gastroenterol Clin Biol 2004;28:C7-C17)

The discovery of at least two cyclooxygenase (COX) iso-enzymes had two major consequences : i) to give a new impetus to the research on lipid metabolism, giving rise to the crystallization of these peculiar membrane enzymes, the characterization of their active sites and their gene regulation, and the identification of new metabolic pathways; ii) the development of new NSAIDs aimed to have an improved safety profile, the coxibs. These drugs are defined by their COX-2 selectivity which is supported by a negligible inhibitory potency on platelet COX-1 *in vitro* and *ex vivo* after oral intake of maximal therapeutic doses. However, the coxibs marketed in France (celecoxib, rofecoxib, parecoxib) are not equivalent in terms of selectivity and some drugs developed by pharmaceutical companies (etoricoxib, lumiracoxib) will be even more selective for COX-2. These "new" coxibs are the final step in the theory of COX-2 selectivity and they will probably be helpful to better define the limitations of the therapeutic concept based on a selective inhibition of this iso-enzyme.

L'enjeu thérapeutique et économique des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) demeurent une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, que ce soit dans le cadre de la prescription médicale ou de celui de l'automédication, en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques ou antalgiques et même, pour 3 d'entre eux (aspirine, flurbiprofène et indobufène [non commercialisé en France]), inhibitrices de l'agrégation plaquettaire [1]. Cependant, la rançon de cette efficacité thérapeutique dépendante d'un mécanisme d'action supposé commun [2], l'inhibition de la bio-

synthèse des prostaglandines par la cyclooxygénase (COX), est qu'ils sont responsables d'une morbi-mortalité importante, générée principalement par leurs effets indésirables digestifs sévères [3] et rénaux [4]. La découverte d'au moins 2 iso-enzymes de la cyclooxygénase, dénommées COX-1 et COX-2, et la perspective de pouvoir distinguer les rôles physiopathologiques des médiateurs qu'elles produisent, a naturellement fait naître l'espoir de développer de nouveaux inhibiteurs de COX qui maintiendraient les propriétés thérapeutiques des AINS sans en conserver les effets indésirables [5]. Comme l'iso-enzyme COX-2 était celle qui était exprimée majoritairement en situation inflammatoire, le concept d'inhibiteur sélectif de la COX-2 (ISC) est né (voir figure 1) et a conduit rapidement à une nouvelle sous-classe d'AINS : les

Correspondance : J.-Y. JOUZEAU, Laboratoire de Pharmacologie et UMR 7561 CNRS-UHP, Faculté de Médecine de Nancy, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex. Tél. : 03 83 68 39 50, Fax : 03 83 68 39 59, E-mail : jouzeau@medecine.uhp-nancy.fr

ou Service de Pharmacologie Clinique et Toxicologie, Hôpital central, CHU de Nancy, Avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, CO 134, 54035 Nancy Cedex. Tél. : 03 83 85 27 54, Fax : 03 83 85 13 84, E-mail : jy.jouzeau@chu-nancy.fr

ABRÉVIATIONS :

AINS: anti-inflammatoires non stéroïdiens.

COX : cyclooxygénase.

ISC : inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase-2.

LO : lipoxygénase.

PGHS : prostaglandine H synthase.

PGG₂ : prostaglandine G₂.

PGH₂ : prostaglandine H₂.

PGI₂ : prostacycline.

cPLA₂ : phospholipase A₂ cytosolique.

sPLA₂ : phospholipase A₂ sécrétée.

PPARS : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes.

TxA₂ : thromboxane A₂.

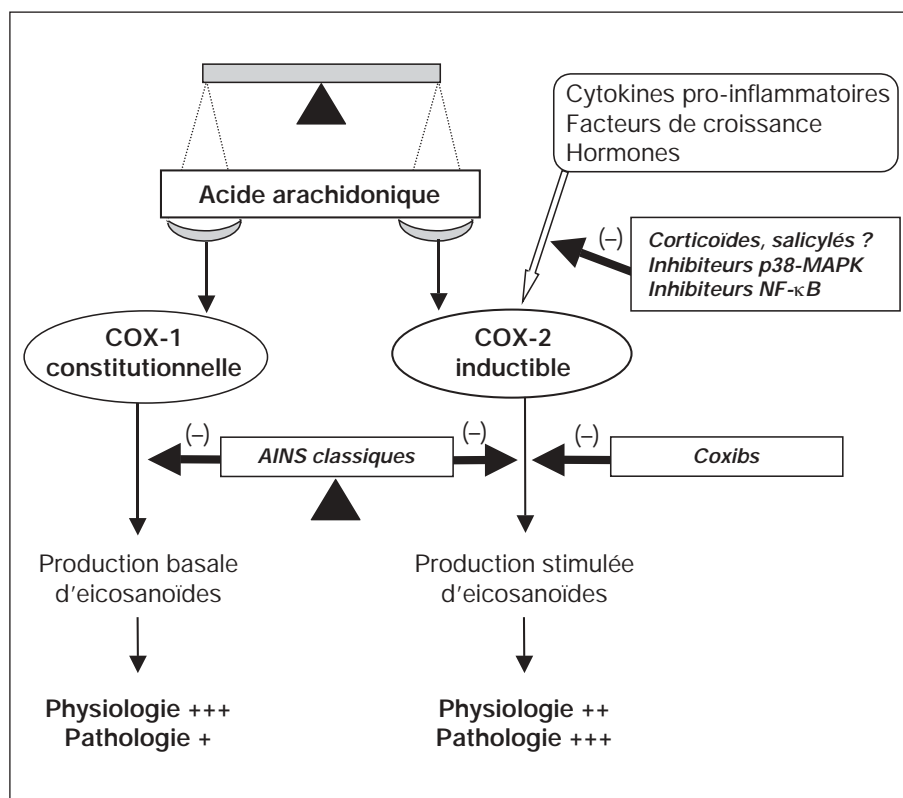


Fig. 1 – Modulation pharmacologique des iso-enzymes de la cyclooxygénase (COX).
 AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens ; NF-κB : “nuclear factor-κB” ; MAPK : “mitogen activated protein kinase”.
Pharmacological modulation of cyclooxygenase (COX) isoenzymes.

coxibs. Après plusieurs années d'expérience thérapeutique avec ces molécules, et malgré leur succès commercial indéniable, la prescription médicale des ISC reste cependant entachée de nombreuses interrogations d'ordre pharmacologique (les ISC sont-ils tous équivalents ?), thérapeutique (doit-on réserver leur usage à certains patients ou au contraire les prescrire largement en première intention ?) ou économique (leur coût élevé par rapport aux AINS classiques est-il compensable par l'amélioration du service médical rendu ?).

Rappel sur le métabolisme de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique ou eicosa-5, 8, 11, 14-tétraénoïque, acide gras à 20 atomes de carbone (C20:4), est un constituant essentiel des membranes cellulaires issu de l'élongation et de la désaturation hépatique de l'acide linoléique [6]. Sa libération par hydrolyse enzymatique à partir des phospholipides membranaires constitue donc l'étape limitante de la biosynthèse des eicosanoïdes. Cette activité est principalement assurée par les phospholipases A₂, cytosoliques (cPLA₂, 85 kDa) ou sécrétées (sPLA₂, 14 kDa), qui sont régulées de façon différente par la concentration en calcium ionisé et selon l'origine intra (cPLA₂) ou extracellulaire (sPLA₂) de cette variation [7]. Les stimulus capables d'activer ces phospholipases A₂, comme la bradykinine, certaines cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1, facteur de nécrose tumorale α) ou l'ionophore calcique A23187 sont donc naturellement des activateurs de la biosynthèse des eicosanoïdes.

L'acide arachidonique peut ensuite subir des biotransformations conduisant à de nombreux métabolites oxydés, les 4 voies principales étant celles des cyclooxygénases (COXs), des lipoxygénases (LOs), des cytochromes P-450 et des isoprostanes. Certains composés sont d'ailleurs issus d'une métabolisation successive par plusieurs de ces systèmes enzymatiques.

Le système enzymatique qui assure les étapes initiales de biotransformation de l'acide arachidonique en prostanoides de la série 2 est une enzyme bi-fonctionnelle : la prostaglandine H synthase (PGHS). Cette enzyme assure, dans des sites actifs distincts, mais proches, une activité dioxygénasique responsable de l'oxydation de l'acide arachidonique en prostaglandine G₂ (PGG₂) et une activité peroxydasique responsable de la réduction de la PGG₂ en prostaglandine H₂ (PGH₂) (voir figure 2 adaptée de [8]). C'est l'activité globale de biotransformation de l'acide arachidonique en endoperoxydes cycliques (PGG₂, PGH₂) que l'on dénomme PGHS ou COX, sachant que le terme COX ne devrait être utilisé *stricto sensu* que pour désigner l'activité dioxygénasique [9]. Cette synthèse a lieu généralement sur la face luminale du réticulum endoplasmique. Bien que les 2 activités enzymatiques soient distinctes, on soulignera que le taux de peroxyde est un régulateur de l'activité dioxygénasique, ce qui permet de comprendre que certaines molécules ayant des propriétés réductrices, comme le paracétamol, puissent moduler l'activité COX de façon dépendante du niveau des peroxydes cellulaires [10].

La conversion de la PGH₂ en prostanoides comme les prostaglandines primaires (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}), le thromboxane A₂ (TxA₂) ou la prostacycline (PGI₂) dépend d'isomérases et de synthases qui sont exprimées sélectivement dans certains tissus ou

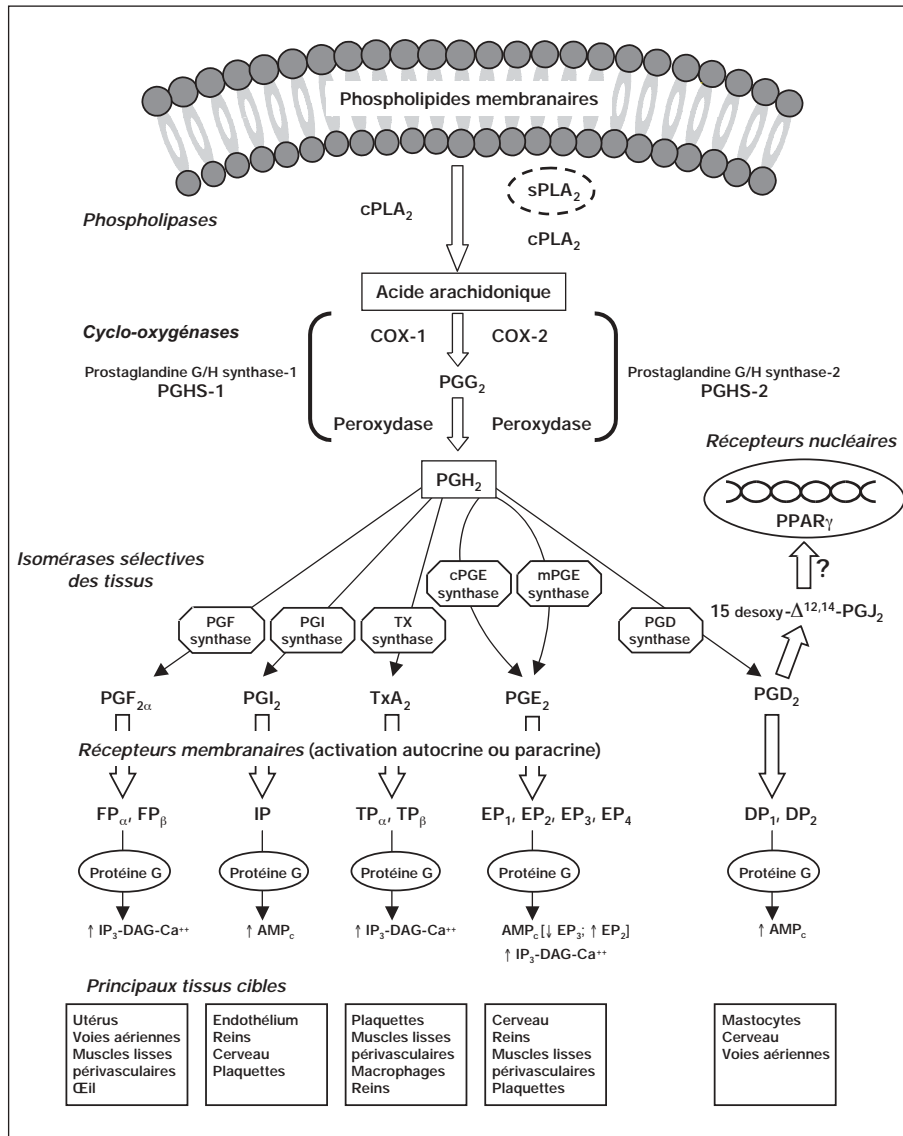


Fig. 2 – Voies de biosynthèse et actions des prostaglandines et du thromboxane (adaptée de [8]).

cPLA₂ : phospholipase A₂ cytosolique ; sPLA₂ : phospholipase A₂ sécrétée ; COX : cyclooxygénase ; PGHS : prostaglandine H synthase ; PG : prostaglandine ; TX : thromboxane ; cPGE : prostaglandine E synthase cytosolique ; mPGE : prostaglandine E synthase membranaire ; FP : récepteur de la prostaglandine F ; IP : récepteur de la prostacycline ; TP : récepteur du thromboxane ; EP : récepteur de la prostaglandine E ; DP : récepteur de la prostaglandine D ; PPAR_γ : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssomes ; IP₃ : inositol triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; AMP_c : adénosine monophosphate cyclique.

Biosynthesis and actions of prostaglandins and thromboxane (adapted from [8]).

certain types cellulaires (voir figure 2). Ces synthases sont situées à proximité de la PGHS sur la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique, ce qui permet une biotransformation rapide de la PGG₂ après qu'elle ait traversé la membrane par diffusion passive. À la différence de celle des endoperoxydes cycliques, il existe donc une "spécialisation tissulaire" de la biosynthèse des prostanoides [9]. Les exemples les plus démonstratifs sont la biosynthèse préférentielle de PGI₂ dans l'endothélium vasculaire, de TxA₂ dans les plaquettes, de PGE₂ dans le derme ou de PGF_{2α} dans les vésicules séminales. Ceci conditionne la nature des médiateurs choisis pour évaluer indirectement l'activité COX dans les études *in vitro* ou *in vivo*, 6-céto-PGF_{1α} comme témoin de la synthèse endothéliale de PGI₂ ou TxB₂ comme témoin de la biosynthèse de TxA₂ lors de l'activation plaquettaire par exemple. En corollaire, certains systèmes biologiques d'étude de

l'activité COX sont peu pertinents si le type cellulaire choisi synthétise majoritairement un autre métabolite que celui qui est dosé, comme par exemple l'étude de la production de TxB₂ par les macrophages activés [11], alors que ceux-ci produisent principalement de la PGE₂. La nature des prostaglandines produites peut également varier au sein d'un même organe, comme cela a été démontré entre les différents segments du tube digestif [12], et est parfois sujette à des variations inter-espèces entre l'homme et les rongeurs. En dehors de cas particuliers des plaquettes *in vivo* et des lignées cellulaires *in vitro*, il faut également interpréter prudemment les concentrations de prostanoides vis-à-vis de leur dépendance aux iso-enzymes de la COX. Ainsi, après avoir longtemps pensé que la PGI₂ circulante était produite majoritairement par la COX-1 endothéliale, on a découvert récemment qu'elle dépendait de façon importante de l'activité COX-2 [13].

Les synthèses biotransformant la PGH_2 sont également un élément essentiel de la régulation de la production des prostanoides, puisque certaines de leurs activités diminuent avec l'âge [14] ou, au contraire, sont augmentées par les médiateurs de la réaction inflammatoire [15]. Enfin, plus récemment, la voie de biotransformation de la PGD_2 en 15-desoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J_2 (15-d-PG J_2) [16] a été à l'origine de nombreuses investigations, puisque ce métabolite participerait à la résolution de la réaction inflammatoire [17].

La biotransformation de l'acide arachidonique par certaines iso-enzymes de cytochromes P-450, encore appelée "voie des époxydes", conduit à des dérivés oxydés de l'acide eicosatriénoïque (EETs, acides EpoxyEicosatriénoïques) [18] dont certains, comme le 5,6 EET, peuvent ensuite être métabolisés par les COXs et contribuer aux effets biologiques des prostaglandines [19]. À l'inverse, cette biotransformation dépendante des cytochromes P-450 peut également concerner les métabolites de l'acide arachidonique produits sous l'action des COXs puisque, par exemple, les prostaglandines E sont métabolisées dans le liquide séminal en dérivés 19-hydroxylés par le cytochrome P-450 4F8 (CYP4F8) [20].

Enfin, l'oxydation de l'acide arachidonique ou de ses esters par les espèces réactives dérivées de l'oxygène génère des isoprostanes (stéréoisomères d'eicosanoïdes), dont certains, comme la 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ (15-F $_{2t}$ -IsoP) et la 8-iso-PGE $_2$ (15-E $_{2t}$ -IsoP), partagent les propriétés vasorégulatrices des prostaglandines en interagissant avec leurs récepteurs TP et/ou EP [21]. Très récemment, les liens étroits qui existent entre ces médiateurs et les prostaglandines ont été renforcés puisque, d'une part, les isoprostanes se sont révélés être des activateurs des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs) [22] et que, d'autre part, une synthèse de prostaglandines D $_2$ et E $_2$, indépendante de l'activité COX, a été rapportée à partir des 8-iso-PGD $_2$ (15-D $_{2t}$ -IsoP) et 8-iso-PGE $_2$ (15-E $_{2t}$ -IsoP) [23].

Des récepteurs aux effets des prostaglandines

Le rôle physiopathologique des prostaglandines a fait l'objet de nombreuses revues [24] dont il est impossible de reproduire ici l'exhaustivité. Plus récemment, une myriade de travaux de recherche, faisant notamment appel à l'utilisation d'animaux déficients [25], a tenté d'attribuer leurs fonctions à l'une ou l'autre des iso-enzymes de la COX [26]. On rappellera seulement que les prostanoides ont un rôle essentiel dans plusieurs grandes fonctions physiologiques comme la cytoprotection digestive, l'hémodynamique rénale et tout particulièrement le maintien de la pression de filtration glomérulaire en cas d'hypoperfusion, l'hémostase primaire et la régulation du tonus vasculaire, le maintien de l'ouverture du canal artériel chez le fœtus, l'ovulation, la nidation et la stimulation de la musculature utérine. Ces médiateurs sont également impliqués dans les processus de prolifération cellulaire et d'immunomodulation, notamment au niveau du tractus digestif [27], et contribuent directement à la genèse de la réaction inflammatoire (vasodilatation, œdème, tuméfaction) et des processus douloureux associés (abaissement du seuil de sensibilisation des terminaisons nerveuses aux substances algogènes) [28]. Ces effets sont médiés par la stimulation de récepteurs membranaires spécifiques de chaque prostanoides [29], sur lesquels les médiateurs agissent de façon autocrine ou paracrine, sachant qu'il existe un recaptage cellulaire des prostaglandines [30]. Il existe au moins 5 types et 11 sous-types de récepteurs à 7 hélices α transmembranaires, qui sont couplés, *via* des protéines Gs, Gi ou Gp, à l'adénylate cyclase ou à la phospholipase C (voir figure 2). Les

effets sur la signalisation intracellulaire sont parfois opposés entre les types de récepteurs (IP et EP $_3$ par exemple), voire entre leurs sous-types (EP $_2$ et EP $_3$ par exemple), ce qui permet d'expliquer, au moins en partie, certains antagonismes fonctionnels des prostaglandines vis-à-vis d'un même tissu ou la variabilité de la réponse observée selon les densités respectives en récepteurs exprimés. Les effets biologiques des prostaglandines relèvent probablement de processus encore plus complexes, puisqu'une proportion non négligeable des prostanoides (20 % pour PGE $_2$) est également retrouvée au niveau intracellulaire [31]. Si cela est cohérent avec l'existence de transporteurs susceptibles de contribuer à l'exportation cellulaire des prostaglandines autres que la PGH_2 [32], on ignore le rôle intracellulaire exact de ces médiateurs. D'autre part, certains métabolites des prostaglandines comme la 15-d-PG J_2 seraient des ligands endogènes des récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs) [33], ce qui leur conférerait la capacité de réguler directement l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réaction inflammatoire [34] (voir figure 2).

Iso-enzymes de la cyclooxygénase

Bien que l'existence de plusieurs activités cyclooxygénasiques ait été soupçonnée depuis longtemps, en raison de la différence du pouvoir inhibiteur des AINS selon les tissus [35] et de l'influence variable des hydroperoxydes sur la catalyse enzymatique [36], l'existence d'au moins 2 iso-enzymes n'a été établie que dans les années 90. Il a fallu, dans un premier temps, que soit mise en évidence l'inhibition sélective d'une activité cyclooxygénasique induite par les cytokines pro-inflammatoires ou les endotoxines bactériennes par les glucocorticoïdes [37]. Dans un deuxième temps, il a fallu que les découvertes indépendantes d'une activité cyclooxygénasique particulière dans les fibroblastes aviaires transformés par l'oncogène *v-src*, les cellules ovariennes de rat stimulées par les gonadolibérines ou les fibroblastes murins stimulés par les esters de phorbol, soient unifiées par le clonage d'un seul et même gène appelé COX-2 [38]. Le clonage des 2 iso-enzymes a été le point de départ de nombreuses expériences visant à étudier leur expression dans les différents tissus de l'organisme (à l'état basal ou pathologique) ainsi que leur régulation par les médiateurs de la réaction inflammatoire ou les facteurs de croissance. Les principales caractéristiques de ces gènes montrent que COX-2 est un gène précoce, pouvant faire l'objet d'une régulation transcriptionnelle (nombreux éléments de réponse à des facteurs de transcription activés par les cytokines) et post-transcriptionnelle (nombreuses séquences d'instabilité dans la région 5' non traduite de son ARNm), ce qui lui confère une grande inductibilité pour réaliser la synthèse stimulée de prostaglandines en situation de stress cellulaire [39]. Par contre, COX-1 a toutes les caractéristiques d'un gène domestique, notamment une très faible inductibilité et une grande stabilité de son ARNm, ce qui le prédispose à synthétiser des prostaglandines lors de l'homéostasie. S'il n'est pas surprenant en lui-même, puisque l'existence de cette nouvelle iso-enzyme a été suggérée pour expliquer les effets antalgiques du paracétamol [40], le clonage récent de COX-3 a révélé qu'il s'agit d'un variant de COX-1 issu d'un épissage alternatif de ce gène. Si son expression préférentielle dans le système nerveux central le prédispose à participer à la transmission des processus douloureux, le gène COX-3 se singularise surtout par sa séquence qui dérive de celle de COX-1 par la persistance de l'intron 1 [41].

D'un point de vue enzymatique, les 3 iso-enzymes possèdent des sites actifs de type dioxygénase et peroxydase capables d'assurer la biotransformation classique de l'acide arachido-

nique en PGH₂. Les protéines ont d'ailleurs une grande homologie de séquence, avec une conservation importante des acides aminés composant le site actif COX. Parmi les principales différences entre ces iso-enzymes on soulignera que : *i*) COX-2 a une sélectivité de substrat plus large que celle de COX-1, ce qui est cohérent avec la plus grande largeur de son site actif, mais lui permet également de synthétiser une plus grande variété de médiateurs lipidiques [42] ; *ii*) COX-2 est beaucoup plus sensible que COX-1 au tonus peroxydasique, de sorte qu'en présence d'un taux faible de peroxydes endogènes, l'acide arachidonique sera métabolisé préférentiellement par COX-2 plutôt que par COX-1 [43] ; *iii*) COX-1 et COX-2 diffèrent surtout par leurs extrémités N et C-terminales, ce qui est mis à profit pour fabriquer des anticorps spécifiques contre chaque iso-enzyme ; *iv*) COX-3 a des propriétés catalytiques nettement inférieures à celles des 2 autres iso-enzymes, même si elle est la plus sensible au pouvoir inhibiteur du paracétamol [44] ; *v*) l'activité fonctionnelle de COX-1 est couplée à celles de la cPLA₂ en amont et de la cPGES en aval, alors que celle de COX-2 dépend également de la sPLA₂ en amont et uniquement de la mPGES en aval (voir figure 1), suggérant une biotransformation différente de l'acide arachidonique selon que la cellule fait appel à des enzymes constitutionnelles (homéostasie) ou inductibles (stimulation) [45]. En revanche, contrairement aux premières expériences de microscopie confocale ayant suggéré une localisation préférentielle de COX-2 dans la membrane nucléaire [46], on admet désormais que les 2 iso-enzymes ont une répartition uniforme dans les membranes cellulaires [47].

La structure tridimensionnelle des COXs, qui a été résolue récemment [48-50], a permis de montrer qu'il s'agit de protéines membranaires monotopiques (insérées dans un seul des 2 feuillettes de la bicouche phospholipidique) présentes sous la forme d'homodimères glycosylés. Cette localisation permet le passage direct de l'acide arachidonique libéré à partir des membranes vers le site actif (voir figure 3 adaptée de [51]). Chaque monomère comprend trois domaines distincts : *i*) un petit domaine rappelant la structure de l'EGF ("Epidermal Growth Factor"), qui facilite la stabilisation du dimère ; *ii*) un motif hydrophobe de liaison à la membrane, qui permet l'insertion du dimère et le transit des acides gras membranaires ; *iii*) un domaine enzymatique globulaire comprenant un site dioxygénase et un site peroxydase (de type héminique) distincts. Les interactions spatiales entre le domaine enzymatique et le motif de liaison à la membrane délimitent un long canal hydrophobe dans lequel est métabolisé l'acide arachidonique (voir figure 2). La comparaison des 2 sites actifs des iso-enzymes de COX a confirmé le rôle commun essentiel de plusieurs acides aminés : *i*) Arg¹²⁰ ou ¹⁰⁶, située à l'entrée du site actif et maintenue sous une forme protonée (NH₃⁺) grâce à un pont salin avec un Glu⁵²⁴ ou ⁵¹⁰, qui est le site de fixation des dérivés carboxyliques (COO⁻), qu'il s'agisse de l'acide arachidonique ou des AINS ; *ii*) Tyr³⁵⁵ ou ³⁷¹, située au sommet du site actif, qui est l'acide aminé catalytique nécessaire à l'insertion d'une première molécule d'oxygène sur l'acide arachidonique ; *iii*) Ser⁵³⁰ ou ⁵¹⁶, située au milieu du site actif, mais à proximité de l'acide aminé catalytique, qui est le site d'acétylation par l'aspirine (voir figure 2). Cette comparaison a également montré que : *i*) le site actif de COX-2 est plus large (+ 25 %) et plus volumineux (+ 17 %) que celui de COX-1, ce qui explique à la fois sa sélectivité de substrat moins restreinte et sa capacité de synthétiser de l'acide 15-R-hydroxy-eicosatétraénoïque (15-R-HETE) après acétylation par l'aspirine [52], alors que toute synthèse est bloquée dans COX-1 ; *ii*) le site actif de COX-2 possède une poche latérale supplémentaire par rapport à celui de COX-1, cette différence étant due à la substitution d'un acide aminé très volumineux de COX-1 (Ileu⁵²³) par un acide aminé peu volumineux (Val⁵⁰⁹) dans COX-2 ; *iii*) le site actif de COX-2 possède une voute apicale plus flexible que celle de COX-1 ;

iv) COX-2 est plus flexible que COX-1, car elle peut exister sous plusieurs conformations (voir figure 2). Les co-cristallisations des iso-enzymes avec l'acide arachidonique, l'aspirine, le flurbiprofène ou le célécoxib ont démontré [53] que : *i*) les AINS classiques se fixent prioritairement sur l'Arg¹²⁰ ou ¹⁰⁶ selon l'iso-enzyme, de façon compétitive avec l'acide arachidonique ; *ii*) les coxibs se positionnent prioritairement dans le site actif de COX-2 via des interactions hydrophobes, mais pénètrent mal dans le site actif de COX-1 (voir figure 2). Ces études ont ainsi apporté des bases explicatives aux différences de pouvoir inhibiteur observées entre les AINS et les coxibs, tout en confirmant la possibilité de développer des inhibiteurs sélectifs de COX-2 par l'analyse des relations structure-activité de molécules tricycliques non acides.

Sélectivité des AINS vis-à-vis des iso-enzymes de la COX

La découverte de 2 iso-enzymes de la COX a tout naturellement conduit les chercheurs et les industriels pharmaceutiques à développer des systèmes biologiques permettant de comparer le pouvoir inhibiteur des AINS conventionnels sur chacune des iso-enzymes, mais surtout de cribler des molécules susceptibles d'inhiber sélectivement COX-2 [54]. À dessein d'avoir des activités enzymatiques distinctes pour COX-1 et COX-2, de très nombreux systèmes *in vitro* ont été proposés [5, 55]. Dans ces systèmes, le pouvoir inhibiteur d'un AINS est exprimé sous la forme de sa concentration inhibitrice 50 (CI₅₀, concentration à laquelle il diminue de 50 % l'activité enzymatique) et sa sélectivité par un indice correspondant au rapport des CI₅₀ pour chaque iso-enzyme. Après des balbutiements concernant le sens dans lequel le rapport des CI₅₀ devait être exprimé, on admet désormais que l'indice de sélectivité doit être exprimé sous la forme du rapport CI_{50COX-1}/CI_{50COX-2} et que, par conséquent, un indice élevé atteste d'une sélectivité pour COX-2. Cependant, les indices de sélectivité ne doivent être considérés que comme des indicateurs pharmacologiques dont l'interprétation nécessite une connaissance critique des systèmes dans lesquels ils ont été déterminés. Ceci est d'autant plus important qu'une nouvelle classification des AINS, fondée sur leur sélectivité pour les COXs plutôt que sur leur structure chimique, a été proposée [56]. En effet, les sources de variabilité ont été très nombreuses en raison des caractéristiques de chaque système biologique et des conditions expérimentales choisies [5, 55]. Ainsi, les indices peuvent différer selon la nature (humaine ou animale) ou la pureté (homogénats cellulaires ou enzymes purifiées) des enzymes utilisées, selon la possibilité offerte aux AINS de franchir ou non les membranes cellulaires (cellules intactes ou lysées, microsomes), selon la pertinence physiologique des cellules utilisées (cellules résidentes, immortalisées ou transfectées), selon la durée de la pré-incubation entre l'AINS et le système enzymatique (de quelques minutes à plusieurs heures), selon la durée nécessaire à l'induction d'expression de COX-2 (immédiate à 24 heures), selon la source d'acide arachidonique utilisée (endogène ou exogène) et la concentration éventuellement ajoutée (de 2 à 100 μmoles/L), selon la possibilité offerte aux AINS de se fixer ou non aux protéines du milieu (absence, concentration faible ou physiologique de protéines). La conséquence immédiate est que les indices de sélectivité des molécules ne sont comparables que lorsqu'ils ont été déterminés dans le même système et les mêmes conditions expérimentales [57].

La deuxième conséquence a été de chercher le modèle cellulaire qui se rapprocherait le plus des conditions d'utilisation thérapeutiques des AINS et pourrait être considéré comme un

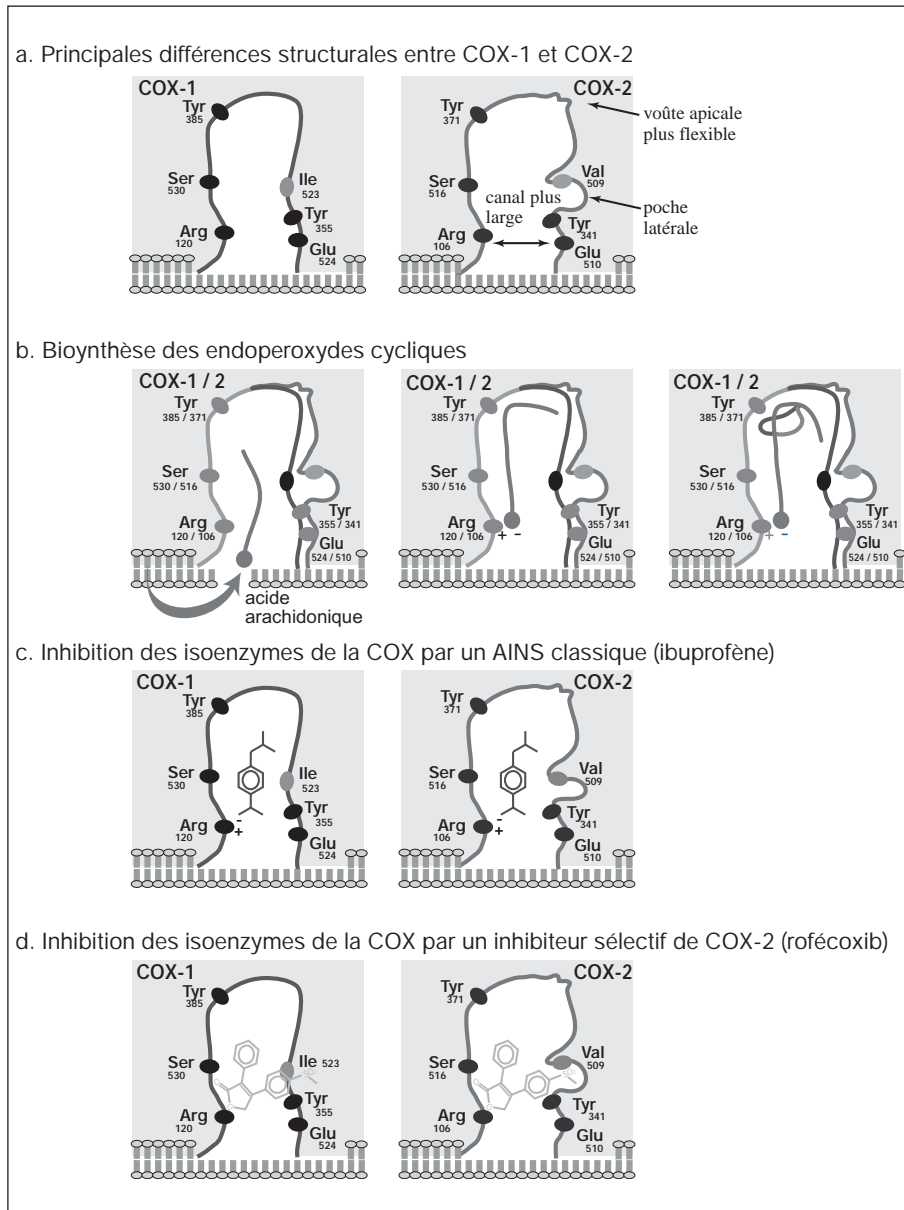


Fig. 3 – Comparaison des site actifs des iso-enzymes de la cyclooxygénase et de leur inhibition par les AINS conventionnels ou les inhibiteurs sélectifs de COX-2 (adaptée de [51]).

a) structure comparée des sites actifs ; b) biotransformation de l'acide arachidonique ; c) inhibition des sites actifs par un AINS conventionnel (carboxylique) ; d) inhibition des sites actifs par un inhibiteur sélectif de COX-2 (coxib). Lire dans le texte pour plus de détails.

Comparison of cyclooxygenase isoenzymes active sites and their inhibition by classical NSAIDs or selective COX-2 inhibitors (adapted from [51]).

système de référence. Ce modèle est le système dit "sang total" utilisant les éléments figurés comme source d'enzymes [58]. Dans ce modèle, l'activité inhibitrice sur COX-1 est mesurée par la synthèse de thromboxane B₂, métabolite stable du thromboxane A₂, consécutive à l'activation plaquettaire par la thrombine lors de la coagulation spontanée (1 h à 37°C) et l'activité inhibitrice sur COX-2 par la synthèse de prostaglandine E₂ lors de l'activation monocyttaire par une endotoxine bactérienne (10 µg/ml de LPS pendant 24 h à 37°C). Il est indéniable que ce système offre de nombreux avantages par rapport aux autres systèmes cellulaires en ce sens qu'il fait appel à des cellules cibles des AINS dans l'organisme, qu'il reproduit un taux physiologique de protéines autorisant la forte fixation protéique des AINS, qu'il prend en compte la capacité des AINS de pénétrer dans les cellules et qu'il permet de mesurer l'inhibition des 2 iso-

enzymes à partir d'un même prélèvement sanguin [59]. Une limite de ce système est cependant que le pouvoir inhibiteur sur COX-1 est mesuré après 1 h d'incubation, alors que celui sur COX-2 l'est seulement après 24 h, puisque c'est le temps nécessaire à l'expression optimale de la COX-2 leucocytaire en réponse au LPS. Ceci pourrait favoriser indirectement les indices de sélectivité des inhibiteurs sélectifs de COX-2 par rapport à ceux des AINS conventionnels, puisqu'ils inhibent COX-1 de façon rapidement réversible, mais COX-2 par un mécanisme lentement réversible (dit d'interaction lente) [60]. Une version modifiée de ce système a été proposée, dans laquelle le pouvoir inhibiteur sur COX-2 est étudié, en présence de sang total, vis-à-vis d'une lignée exprimant fortement cette iso-enzyme, mais la comparaison des AINS conventionnels avec les ISC n'en a pas été significativement modifiée [61].

La plus grande qualité du système "sang total", est probablement qu'il permet également de mesurer le pouvoir inhibiteur sur les COXs *ex vivo*, après prise orale des AINS à posologie thérapeutique [59]. Ceci permet de prendre en considération la pharmacocinétique des molécules et notamment l'influence éventuelle de leurs métabolites sur l'inhibition des COXs, puisque certains AINS pourraient perdre leur sélectivité en étant rapidement transformés en dérivés inactifs [62]. Ceci permet également de comparer les indices de sélectivité obtenus *in vitro* et *ex vivo* chez l'homme, même si le calcul du pouvoir inhibiteur à partir des courbes dose-réponse obtenues *in vitro* et des concentrations circulantes d'AINS mesurées chez les patients n'est pas extrapolable pour tous les AINS [63]. Une sélectivité pour COX-2 se traduit alors par l'absence d'inhibition de l'activité COX-1 plaquettaire mesurée *ex vivo* par la biosynthèse du thromboxane B₂, confirmant que les ISC sont avant tout des molécules n'inhibant pas l'activité de COX-1 et non des molécules inhibant plus efficacement l'activité de COX-2 que les AINS classiques [64]. La synthèse du thromboxane est d'ailleurs un indicateur beaucoup plus sensible de l'effet inhibiteur des AINS que les tests d'agrégation plaquettaire, de sorte qu'une inhibition substantielle de ce paramètre biologique peut être observée sans répercussion sur les tests plaquettaires [65]. Il faut toutefois veiller à ne mesurer ce pouvoir inhibiteur que lorsque les concentrations circulantes d'AINS sont maximales, c'est-à-dire après prise répétée du médicament, puisqu'il existe un facteur d'accumulation de 1,5 à 2 pour les molécules à demi-vie longue [63]. Sur la base de la mesure de ce pouvoir inhibiteur après prise orale de posologies thérapeutiques des AINS, il est établi que les ISC n'inhibent pas significativement l'activité COX-1 plaquettaire aux plus fortes posologies recommandées, alors que les AINS conventionnels l'inhibent dès les plus faibles posologies efficaces [66]. Certaines molécules, comme le méloxicam et le nimésulide, qui n'inhibent significativement l'activité COX-1 plaquettaire qu'aux plus fortes posologies recommandées, sont parfois appelés inhibiteurs préférentiels de COX-2 [67]. Cette distinction provoque cependant une certaine confusion, qui est d'ailleurs entretenue par la littérature anglo-saxonne dans laquelle "selective" peut dire préférentiel, puisque "specific" veut souvent dire sélectif. Bien qu'elle n'ait pas de caractère acide, ce qui la distingue nettement des AINS classiques et contribue probablement l'amélioration de sa tolérance digestive, la nabumétone (ou plus exactement son métabolite actif l'acide 6-méthoxy-2-naphtylacétique) n'est pas un inhibiteur sélectif de COX-2 [68].

Une autre démonstration clinique de cette sélectivité pour COX-2, beaucoup moins usitée pour des raisons éthiques évidentes, est de vérifier l'absence d'inhibition de l'activité COX-1 dans des biopsies gastriques. En effet, il a été démontré que le pouvoir inhibiteur des AINS sur des biopsies de muqueuse gastrique était proche de celui mesuré sur les plaquettes sanguines, confirmant que la COX-1 avait une sensibilité équivalente dans ces deux tissus [69]. Rappelons simplement que les concentrations locales d'AINS atteintes dans le tube digestif sont nettement supérieures à celles mesurées dans le sang, de sorte que la probabilité d'une absence d'inhibition de la COX-1 tissulaire n'a de pertinence que pour un indice de sélectivité élevé sur sang total. De plus, pour pertinente qu'elle soit, la mesure d'une inhibition gastrique des COXs représente un mélange de plusieurs types cellulaires et est probablement sujette à une variabilité selon le site de biopsie.

Enfin, en pharmacologie préclinique, la sélectivité d'inhibition des iso-enzymes de la COX est établie en utilisant des modèles classiques d'inflammation aiguë (œdème à la λ carragénine) ou chronique (polyarthrite par adjuvant), de douleur (test de Randall et Sellito) ou de fièvre (fièvre à la levure de bière) et des modèles de tolérance digestive comme la recherche d'ulcères gastroduodénaux ou de perte fécale d'hématies mar-

quées au chrome 51 [70]. Dans ces conditions, la sélectivité pour COX-2 est évaluée soit par un indice de sélectivité, correspondant au rapport des doses efficaces 50 (DE₅₀, dose inhibant de 50 % l'activité) sur la synthèse de prostaglandines dans la muqueuse gastrique et les tissus inflammatoires, soit par un index de "sécurité", correspondant au rapport de la dose ulcérogène sur la dose efficace 50 pour l'un des paramètres d'efficacité. Dans les deux cas, une sélectivité pour COX-2 se traduit par un indice élevé. Néanmoins, l'index de "sécurité" a deux principales limites en tant qu'évaluateur de la sélectivité pour les iso-enzymes de COX : *i*) il varie selon le test d'efficacité que l'on choisit puisque, indépendamment de la molécule étudiée, la DE₅₀ est toujours beaucoup plus faible dans la polyarthrite par adjuvant que dans l'œdème à la carragénine [71] ; *ii*) il n'est pertinent que si les effets mesurés dépendent exclusivement de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines, ce qui est loin d'être le cas pour le pouvoir ulcérogène [72] et l'effet anti-œdémateux [73].

Principales caractéristiques des inhibiteurs sélectifs de COX-2

Les coxibs commercialisés en France se caractérisent chimiquement [74] par : *i*) l'absence de fonction acide carboxylique, ce qui leur confère un pouvoir irritant digestif réduit, mais est directement responsable de leur faible hydrosolubilité et de la difficulté de mettre au point des formes injectables de ces molécules ; *ii*) une structure volumineuse contenant 2 grands cycles aromatiques reliés à un hétérocycle central, ce qui leur confère probablement une liposolubilité supérieure aux AINS classiques ; *iii*) la présence de groupements fonctionnels méthylsulfone pour le rofécoxib [75] ou sulfonamide pour le célécoxib [76] et le parécoxib [77], ce qui expose au risque de réaction allergique croisée avec ces 2 dernières molécules chez les patients ayant des antécédents d'allergie aux sulfamides (para-amino-sulfonamides). La plupart des coxibs en développement dans l'industrie pharmaceutique, ou en cours d'enregistrement auprès des autorités sanitaires, ont des structures proches de ces premières molécules, dont elles conservent la structure tricyclique et les groupements fonctionnels méthylsulfone pour l'étoricoxib Arcoxia® [78] ou sulfonamide pour le valdécoxib Bextra® [79], et ne diffèrent principalement que par la nature de l'hétérocycle central : pyridinyl pour l'étoricoxib au lieu de furanone pour le rofécoxib, isoxazole pour le valdécoxib au lieu de pyrazole pour le célécoxib. Cependant, l'homogénéité structurale du groupe des coxibs n'est pas définitive puisque de nouvelles structures chimiques font leur apparition comme le lumiracoxib Prexige® [80], récemment commercialisé au Mexique, qui est une molécule proche du diclofénac ayant un squelette d'acide phénylacétique et dépourvu de groupements sulfonés (voir tableau I).

Même si peu d'études ont comparé les coxibs entre eux dans les mêmes conditions expérimentales [80, 81], les indices de sélectivité sur sang total dont on dispose montrent que le rofécoxib est plus sélectif de COX-2 que le célécoxib, ce que confirment les données d'inhibition de synthèse du thromboxane *ex vivo* : aucune inhibition à une posologie 20 à 40 fois supérieure à la posologie maximale recommandée pour le rofécoxib [75], inhibition significative à partir d'une posologie double de la posologie maximale recommandée pour le célécoxib [76]. Le valdécoxib et sa pro-drogue, le parécoxib, ont une sélectivité intermédiaire entre celles du rofécoxib et du célécoxib [81]. En revanche, l'étoricoxib est environ 3 à 4 fois plus sélectif de COX-2 que le rofécoxib, bien qu'il semble nettement moins sélectif que le lumiracoxib [80]. Il est donc manifeste que les coxibs de

Tableau I. – Principales caractéristiques des inhibiteurs sélectifs de COX-2 (coxibs).
Main characteristics of the selective COX-2 inhibitors (coxibs).

Molécules	Rofécoxib [75]	Célécoxib [76]	Etoricoxib [78]	Valdécoxib [79]	Lumiracoxib [80]
Spécialités	Vioxx®	Célébrex®	Arcoxia®	Bextra®	Prexige®
Laboratoires	MSD-Chibret	Pharmacia	MSD-Chibret	Pharmacia	Novartis
AMM France	23/11/1999	24/5/2000	Absence	Absence ^a	Absence
Indications	OA - PR	OA - PR	OA - PR - goutte douleurs	OA - PR douleurs	OA - douleurs
Posologie quotidienne	12,5-25 mg (OA) 25 mg (PR)	200 mg (OA) 200-400 mg (PR)	60 mg (OA) - 90 mg (PR) 120 mg (douleurs)	10 mg (OA, PR) 20-40 mg (douleurs)	400 mg
Structure chimique	Diaryl-furarone Méthylsulfone	Diaryl-pyrazole Sulfonamide	Pyridinyl-phényl-pyridine Méthylsulfone	Diaryl-isoxazole Sulfonamide	Phénylamino-benzyle Acide acétique
Fvoie orale	92-93 %	25-40 %	≈ 100 %	83 %	?
Tmax	2-3 h	2-3 h	1 h	2-3 h	2-3 h
Vd	86-91 L	300-600 L	120 L	86 L	?
Fixation protéique	87 %	97 %	92 %	98 %	?
Métabolisme	Hépatique réduction cytosol. + CYP-450 inhibiteur CYP-1A2	Hépatique CYP-2C9 (polymorphisme) inhibiteur CYP-2D6	Hépatique CYP-3A4 inhibiteur CYP-2C19	Hépatique CYP-3A4 + 2C9 inhibiteur CYP-2D6	Hépatique CYP-3A4 ?
T1/2	17 h (9-21)	11 h (8-12)	22 h	8 h (5-10)	3-6 h

^a : la prodrogue injectable du valdécoxib (parécocoxib DYNASTAT[®]) a obtenu une AMM le 22/3/2002 dans l'indication "traitement à court terme des douleurs postopératoires" ; AMM : autorisation de mise sur le marché ; OA : arthrose ; PR : polyarthrite rhumatoïde ; Fvoie orale : biodisponibilité absolue par voie orale ; Tmax : temps nécessaire pour obtenir une concentration plasmatique maximale ; Vd : volume de distribution ; CYP : cytochrome P-450 ; T1/2 : demi-vie d'élimination.

"deuxième génération" seront encore plus sélectifs de COX-2 que ne le sont les molécules actuellement disponibles en France, ce qui posera le problème de leur positionnement dans l'arsenal thérapeutique. Cependant, comme ces molécules poussent à l'extrême le concept de sélectivité pour COX-2, elles seront probablement susceptibles d'apporter des éclaircissements sur les effets indésirables cardio-vasculaires ou rénaux des ISC ou la fréquence non négligeable de leurs effets indésirables digestifs [82].

Hormis leur sélectivité vis-à-vis des iso-enzymes de la COX, les coxibs diffèrent également par leur pharmacologie clinique (voir tableau I). Ainsi, leur biodisponibilité par voie orale, peut varier de 25 à 40 % pour le célécoxib [76] à près de 100 % pour l'étoricoxib [78]. Leur volume apparent de distribution est de l'ordre d'une centaine de litres, ce qui est nettement supérieur à celui des AINS classiques et pourrait traduire leur plus grande liposolubilité. Le célécoxib doit être considéré à part, car son très grand volume de distribution (plusieurs centaines de L) est probablement la conséquence directe de sa médiocre biodisponibilité. Le temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale après prise orale des médicaments est généralement de l'ordre de 2 à 3 h, ce qui pourrait expliquer une certaine latence d'efficacité dans les modèles de douleurs aiguës. Ce paramètre peut être amélioré par l'administration parentérale des produits, comme dans le cas du parécocoxib, ou par l'usage de l'étoricoxib lorsqu'il sera disponible. Certains coxibs ont cependant un effet antalgique prolongé par rapport aux AINS conventionnels [83]. La fixation aux protéines plasmatiques est élevée pour toutes les molécules, même s'il convient de rappeler que l'absence de groupement acide carboxylique (à l'exception du lumiracoxib) diminue théoriquement le risque d'interaction médicamenteuse par défixation protéique. En revanche, leur biotransformation majoritairement hépatique

constitue une source importante d'interactions médicamenteuses, d'autant que plusieurs coxibs se comportent expérimentalement comme des inhibiteurs de certaines isoformes de cytochrome P-450 (CYP-1A2, CYP-2D6 et CYP-2C19) impliquées dans la biotransformation de médicaments à index thérapeutique étroit [84]. D'autre part, il est important de mentionner que : *i*) les coxibs de deuxième génération dépendent majoritairement du CYP-3A4 pour leur biotransformation et que ce cytochrome métabolise de très nombreux médicaments ayant une marge thérapeutique étroite, comme la ciclosporine ; *ii*) le CYP-2C9, qui métabolise le célécoxib, fait l'objet d'un polymorphisme génétique, peu fréquent chez les Caucasiens, mais qui concerne également de façon stéréosélective la biotransformation de la warfarine. Ceci permet de comprendre que l'instauration d'un traitement par célécoxib puisse augmenter l'INR (indice normalisé international) chez des patients traités par un anti-vitamine K [85], même si le risque hémorragique encouru est inférieur à celui provoqué par un AINS conventionnel [86]. La demi-vie d'élimination des coxibs est très variable, puisqu'elle est courte pour le lumiracoxib, intermédiaire pour le célécoxib et le valdécoxib, et longue pour le rofécocoxib et l'étoricoxib. Ceci conditionne généralement le schéma thérapeutique, même si une administration quotidienne de célécoxib s'est révélée aussi efficace qu'une administration biquotidienne dans l'arthrose [87].

En conclusion, la découverte d'au moins 2 iso-enzymes de la cyclooxygénase a bouleversé le monde de la recherche sur l'inflammation et a conduit, en moins d'une dizaine d'années, à la mise sur le marché d'une nouvelle sous-classe d'AINS : les coxibs. L'expérience pharmacologique et clinique a cependant démontré que la dichotomie entre une "bonne" COX-1 et une "mauvaise" COX-2 était beaucoup trop manichéenne et que les

ISC ne sont pas aussi "révolutionnaires" que ce qui était attendu. Il n'en demeure pas moins que ces molécules ne sont pas équivalentes en termes de sélectivité pour COX-2 et que le développement de coxibs de "deuxième génération" ayant une sélectivité accrue permettra de tester les limites de ce concept thérapeutique.

RÉFÉRENCES

- Simon LS. Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:159-66.
- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971;231:232-5.
- Lichtenstein DR, Syngal S, Wolfe MM. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract. The double-edged sword. *Arthritis Rheum* 1995;38:5-18.
- Brater DC. Anti-inflammatory agents and renal function. *Semin Arthritis Rheum* 2002;32:33-42.
- Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, Nedelec E, Netter P. Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs* 1997;53:563-82.
- Eberhart CE, Dubois RN. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1995;109:285-301.
- Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:3-58.
- FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001;345:433-42.
- Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 1996;62:167-215.
- Ouellet M, Percival MD. Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms. *Arch Biochem Biophys* 2001;387:273-80.
- Young JM, Panah S, Satchawatcharaphong C, Cheung PS. Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B₂ production. *Inflamm Res* 1996;45:246-53.
- Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, et al. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase-1 and -2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 1996;111:445-54.
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:272-7.
- Chang WC, Tai HH. Changes in prostacyclin and thromboxane biosynthesis and their catabolic enzyme activity in kidneys of aging rats. *Life Sci* 1984;34:1269-80.
- Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, Kudo I. Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:383-99.
- Negishi M, Koizumi T, Ichikawa A. Biological actions of delta 12-prostaglandin J₂. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995;12:443-8.
- Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2002;2:787-95.
- Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res* 2000;41:163-81.
- Carroll MA, Balazy M, Margiotta P, Falck JR, McGiff JC. Renal vasodilator activity of 5,6-epoxyeicosatrienoic acid depends upon conversion by cyclooxygenase and release of prostaglandins. *J Biol Chem* 1993;268:12260-6.
- Bylund J, Hidestrand M, Ingelman-Sundberg M, Oliu EH. Identification of CYP4F8 in human seminal vesicles as a prominent 19-hydroxylase of prostaglandin endoperoxides. *J Biol Chem* 2000;275:21844-9.
- Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:360-6.
- McNamara P, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostane activation of the nuclear hormone receptor PPAR. *Adv Exp Med Biol* 2002;507:351-5.
- Gao L, Zackert WE, Hasford JJ, Danekis ME, Milne GL, Remmert C, et al. Formation of prostaglandins E₂ and D₂ via the isoprostane pathway: a mechanism for the generation of bioactive prostoglandins independent of cyclooxygenase. *J Biol Chem* 2003;278:28479-89.
- Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 1986;55:69-102.
- Langenbach R, Loftin C, Lee C, Tiano H. Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1237-46.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, van de Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12:1063-73.
- Shiff SJ, Rigas B. The role of cyclooxygenase inhibition in the anti-neoplastic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs). *J Exp Med* 1999;190:445-50.
- Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001;107:1491-5.
- Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:535-56.
- Schuster VL. Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:633-47.
- Horton JK, Williams AS, Smith-Phillips Z, Martin RC, O'Beirne G. Intracellular measurement of prostaglandin E₂: effect of anti-inflammatory drugs on cyclooxygenase activity and prostanoid expression. *Anal Biochem* 1999;271:18-28.
- Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 1995;268:866-9.
- Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4318-23.
- Kliwer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:239-63.
- Flower RJ, Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature* 1972;240:410-1.
- Smith WL, Lands WE. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry* 1972;11:3276-85.
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990;265:16737-40.
- Xie W, Robertson DL, Simmons DL. Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Dev Res* 1992;25:249-65.
- Kulkarni SK, Jain NK, Singh A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2000;22:291-8.

40. Botting RM. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase-3? *Clin Infect Dis* 2000;31 Suppl 5:S202-S210.
41. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13926-31.
42. Fiorucci S, de LO, Jr., Mencarelli A, Palazzetti B, Distrutti E, McKnight W, et al. Cyclooxygenase-2-derived lipoxin A4 increases gastric resistance to aspirin-induced damage. *Gastroenterology* 2002;123:1598-606.
43. Lu G, Tsai AL, van Wart HE, Kulmacz RJ. Comparison of the peroxidase reaction kinetics of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1999;274:16162-7.
44. Schwab JM, Schluesener HJ, Laufer S. COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? *Lancet* 2003;361:981-2.
45. Ueno N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, Urade Y, et al. Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A₂. *J Biol Chem* 2001;276:34918-27.
46. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, Dewitt DL, et al. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995;270:10902-8.
47. Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J Biol Chem* 1998;273:9886-93.
48. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature* 1994;367:243-9.
49. Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, Browner MF. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* 1996;3:927-33.
50. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996;384:644-8.
51. Hawkey CJ. COX-2 inhibitors. *Lancet* 1999;353:307-14.
52. Mancini JA, O'Neill GP, Bayly C, Vickers PJ. Mutation of serine-516 in human prostaglandin G/H synthase-2 to methionine or aspirin acetylation of this residue stimulates 15-R-HETE synthesis. *FEBS Lett* 1994;342:33-7.
53. Garavito RM, Malkowski MG, Dewitt DL. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:129-52.
54. Battistini B, Botting R, Bakhle YS. Cox-1 and Cox-2: Towards the development of more selective NSAIDs. *Drugs N Perspec* 1994;7:501-12.
55. Pairet M. Inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. Analysis of the *in vitro* test systems and their clinical relevance. *J Clin Rheumatol* 1998;4:S17-S25.
56. Frolich JC. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:30-4.
57. Vane JR. NSAIDs, Cox-2 inhibitors, and the gut. *Lancet* 1995;346:1105-6.
58. Patrignani P, Panara MR, Sciulli MG, Santini G, Renda G, Patrono C. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* 1997;48:623-31.
59. Patrono C, Patrignani P, Garcia Rodriguez LA. Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *J Clin Invest* 2001;108:7-13.
60. Ouellet M, Percival MD. Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem J* 1995;306 (Pt 1):247-51.
61. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7563-8.
62. Panara MR, Padovano R, Sciulli MG, Santini G, Renda G, Rotondo MT, et al. Effects of nimesulide on constitutive and inducible prostanoid biosynthesis in human beings. *Clin Pharmacol Ther* 1998;63:672-81.
63. Blain H, Boileau C, Lopicque F, Nedelec E, Loeuille D, Guillaume C, et al. Limitation of the *in vitro* whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53:255-65.
64. Vane JR, Warner TD. Nomenclature for COX-2 inhibitors. *Lancet* 2000;356:1373-4.
65. de Meijer A, Vollaard H, de Metz M, Verbruggen B, Thomas C, Novakova I. Meloxicam, 15 mg/day, spares platelet function in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1999;66:425-30.
66. Lipsky LP, Abramson SB, Crofford L, Dubois RN, Simon LS, van de Putte LB. The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J Rheumatol* 1998;25:2298-303.
67. Pairet M, Netter P. [Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: importance and limitations]. *Therapie* 1999;54:433-45.
68. Cipollone F, Ganci A, Panara MR, Greco A, Cuccurullo F, Patrono C, et al. Effects of nabumetone on prostanoid biosynthesis in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995;58:335-41.
69. Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998;104:413-21.
70. Griswold DE, Adams JL. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev* 1996;16:181-206.
71. Futaki N, Yoshikawa K, Hamasaka Y, Arai I, Higuchi S, Iizuka H, et al. NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. *Gen Pharmacol* 1993;24:105-10.
72. Ligumsky M, Golanska EM, Hansen DG, Kauffman GL, Jr. Aspirin can inhibit gastric mucosal cyclo-oxygenase without causing lesions in rat. *Gastroenterology* 1983;84:756-61.
73. Wallace JL, Chapman K, McKnight W. Limited anti-inflammatory efficacy of cyclo-oxygenase-2 inhibition in carrageenan-airpouch inflammation. *Br J Pharmacol* 1999;126:1200-4.
74. Talley JJ. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Prog Med Chem* 1999;36:201-34.
75. Scott LJ, Lamb HM. Rofecoxib. *Drugs* 1999;58:499-505.
76. Davies NM, McLachlan AJ, Day RO, Williams KM. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokinet* 2000;38:225-42.
77. Talley JJ, Bertenshaw SR, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ, Kellogg MS, et al. N-[(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)-phenyl]sulfonyl]propanamide, sodium salt, parecoxib sodium: A potent and selective inhibitor of COX-2 for parenteral administration. *J Med Chem* 2000;43:1661-3.
78. Cochrane DJ, Jarvis B, Keating GM. Etoricoxib. *Drugs* 2002;62:2637-51.
79. Ormrod D, Wellington K, Wagstaff AJ. Valdecoxib. *Drugs* 2002;62:2059-71.

80. Sorbera LA, Castaner J, Bayes M, Silvestre JS. Lumiracoxib. *Drugs Fut* 2002;27:740-7.
81. Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dube D, Ethier D, et al. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296:558-66.
82. Stichtenoth DO, Frolich JC. The second generation of COX-2 inhibitors: what advantages do the newest offer? *Drugs* 2003;63:33-45.
83. Barden J, Edwards JE, McQuay HJ, Moore RA. Oral valdecoxib and injected parecoxib for acute postoperative pain: a quantitative systematic review. *BMC Anesthesiol* 2003;3:1-8.
84. Landrum-Michalets E. Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy* 1998;18:84-112.
85. Haase KK, Rojas-Fernandez CH, Lane L, Frank DA. Potential interaction between celecoxib and warfarin. *Ann Pharmacother* 2000;34:666-7.
86. Knijff-Dutmer EA, van der PJ, Schut G, van de Laar MA. The influence of cyclo-oxygenase specificity of non-steroidal anti-inflammatory drugs on bleeding complications in concomitant coumarine users. *QJM* 2003;96:513-20.
87. Williams GW, Hubbard RC, Yu SS, Zhao W, Geis GS. Comparison of once-daily and twice-daily administration of celecoxib for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Clin Ther* 2001;23:213-27.