

Rôles biologiques de la cyclo-oxygénase 2 : contrôle de son expression et de son activité

par Claude Jacquemin

Institut Pasteur, Unité de Pharmacologie Cellulaire, Unité associée IP/Inserm U485, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France. <cjacquem@pasteur.fr>

Reçu le 3 mai 1999

RÉSUMÉ

Depuis la découverte d'une isoforme inductible de la cyclo-oxygénase (COX-2) à côté de la forme constitutive (COX-1), s'est développée une conception simplificatrice du partage des rôles : à la COX-1 la cytoprotection et à la COX-2 une implication dans l'inflammation et la néoplasie. Des expériences récentes mettant en jeu des anti-inflammatoires non-

stéroïdiens (AINS) spécifiques de l'une ou de l'autre isoforme, ainsi que l'invalidation des gènes correspondants, ont conduit à des prises de position plus nuancées. Ceci d'autant plus que tous les effets des AINS ne sont pas la conséquence de l'inhibition des COX

SUMMARY Biological functions of cyclooxygenase 2: control of its expression and activity

Cyclooxygenase (COX) plays a pivotal role in the biosynthesis of prostanoids. The identification of an inducible isoform, COX-2, besides the constitutive one, COX-1, suggested that the latter was dedicated to cytoprotection, whereas the former was responsible for inflammation and neoplasia. This oversimplification was amended due to the synthesis of new

selective inhibitors of COX-2 and to the deletion of the COX-2 gene, which demonstrated the involvement of the inducible isoform in physiological as well as in pathological functions. Moreover, several reports describe effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs which do not result from the inhibition of COX activity.

INTRODUCTION

L'implication des prostaglandines dans les phénomènes inflammatoires, la fièvre et l'hyperalgésie, a été reconnue dès le début des années 70. La découverte (1) que les AINS inhibaient l'activité de la cyclo-oxygénase (COX), enzyme catalysant la première étape de la cascade des prostaglandines (PG), expliquait leur mode d'action. On se rendit rapidement compte que l'inhibition de la synthèse de la totalité des PG chez un individu entier, homme ou animal, pour corriger des phénomènes inflammatoires, n'avait pas que des effets bénéfiques. Ainsi la suppression des PG produites par l'estomac et l'intestin, qui jouent un rôle cytoprotecteur de l'épithélium muqueux, est à l'origine, dans le premier tissu, d'une baisse du flux sanguin et de la survie, et, dans le second, d'une diminution de la prolifération des cellules souches des cryptes de Lieberkühn.

DONNÉES CLASSIQUES

Les deux COX

Le clonage du gène de la COX en 1988 et la découverte, deux ans plus tard, d'une seconde forme, permit de distinguer la COX-1, constitutive et à laquelle on attribua la cytoprotection, de la COX-2, inductible et associée à première vue aux phénomènes inflammatoires (pour une revue, consulter la réf. 2). L'inhibition, avec une efficacité comparable, des deux isoformes par les AINS alors disponibles, conduisit à effectuer des études comparatives biochimiques et structurales, qui confirmèrent la grande homologie existant entre les deux protéines (y compris pour les sites actifs qui ne diffèrent que par deux résidus d'isoleucine dans la COX-1, remplacés par deux résidus de valine dans la COX-2), ainsi que la ressemblance de leurs caractéristiques cinétiques. Un grand effort fut donc entrepris avec succès pour élabo-

rer des inhibiteurs spécifiques de l'une et de l'autre isoforme, dans le but d'éliminer la COX-2 et ainsi d'évaluer ses effets biologiques à des fins surtout cliniques. Le fait que cette dernière ait été considérée, de manière un peu manichéenne, comme la « mauvaise COX » a été renforcé par la corrélation entre sa surexpression et la tumorigénèse. En effet, il existe des arguments en faveur de l'implication de la COX-2 dans le développement du cancer du colon. C'est ainsi que les souris *Min/+*, qui ont une mutation de la lignée germinale dans le gène *Apc*, et qui constituent un modèle de la polypose adénomateuse familiale humaine, présentent une plus forte expression de la COX-2 (3). Les descendants d'un croisement entre ces souris et des souris, dont le gène de la COX-2 est invalidé, présentent moins de polypes.

Néanmoins, l'invalidation des gènes de la COX-1 ou de la COX-2 apporta des résultats inattendus confirmant des fonctions distinctes pour chacune des deux enzymes, les effets de la COX-2 n'étant pas toujours néfastes. Alors que des souris déficientes en COX-1 sont fertiles mais présentent des difficultés de parturition, les souris déficientes en COX-2 ont de multiples troubles de la reproduction affectant l'ovulation, la fertilisation, l'implantation et la décidualisation (4). En outre, bien que ces mêmes animaux ne souffrent pas d'inflammation intestinale spontanée, comme on pouvait s'y attendre, ils présentent une plus grande susceptibilité à la colite induite par des agents chimiques, tels que le sulfate de dextrane.

De nouveaux récepteurs pour les prostaglandines

Dans la conception traditionnelle, les prostaglandines sont sécrétées et exercent leur action de manière autocrine ou paracrine, par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques à sept domaines transmembranaires. La découverte que les cyclopenténone-prostaglandines, en particulier la 15-désoxy, Δ^{12-14} prostaglandine J2 (PGJ2), dérivées de la PGD2, étaient de bons ligands du Récepteur nucléaire γ Activé par les Proliférateurs de Peroxysomes (PPAR- γ) (5), ajoutée à celle de la localisation périnucléaire de la COX-2, suggérèrent l'existence d'une autre cible pour les prostaglandines. Trois isotopes de PPAR ont été caractérisés : α , β (ou δ) et γ . Ils font partie de la superfamille des récepteurs des hormones stéroïdiennes, thyroïdiennes et des rétinoïdes. Ils sont présents de manière permanente dans le noyau, liés à un élément de réponse du proliférateur de peroxysomes (PPRE), mais ne modifient la transcription de gènes qu'après liaison du ligand et formation d'un hétérodimère avec RXR, le récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque. A l'origine, les PPAR ont été identifiés comme le récepteur des drogues dont les effets transcriptionnels se traduisaient par la prolifération des peroxysomes chez les rongeurs. Aujourd'hui, on considère que leur rôle est essentiel dans le contrôle du métabolisme des lipides et des glucides et qu'ils interviennent dans les désordres métaboliques, tels que le diabète et l'hyperlipidémie, prédisposant à l'athérosclérose. L'identification des fibrates hypolipémiants (clofibrate, WY-14643, etc.) comme des ligands de PPAR α conduisit à rechercher si

des acides gras libres ou certains de leurs dérivés métaboliques pouvaient être des ligands naturels. C'est effectivement le cas, les acides gras polyinsaturés (linoléate, α et γ linoléate, arachidonate), l'acide 8-S hydroxyicosatétraénoïque (8-S HETE), la carbacycline et l'iloprost (analogues de la prostacycline), sont efficaces à des concentrations physiologiques (6, 7).

Régulation de l'expression de la COX-2

Le caractère inductible de la COX-2 et l'analyse de son promoteur montrant la présence de nombreux éléments de réponse pour des facteurs de transcription tels que AP-1 (*activator protein-1*) et NF κ B (*Nuclear Factor κ B*), ont conduit à étudier l'induction de la COX-2 par le *Tumour necrosis factor α* (TNF α) ou l'interleukine-1 (IL-1) dont les cascades de signalisation sont réputées aboutir à l'activation de ces facteurs de transcription (Fig. 1). La liaison du TNF α à son récepteur TNF-R1 provoque le recrutement de TRADD (*TNF receptor-associated death domain protein*) puis d'une protéine kinase RIP (*receptor-interacting protein*) et de TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*). Il en résulte l'activation de NIK (*NF κ B-inducing kinase*) qui phosphoryle et active IKK (*I κ B kinase*) qui elle-même phosphoryle I κ B au sein du complexe I κ B-NF κ B, ce qui pro-

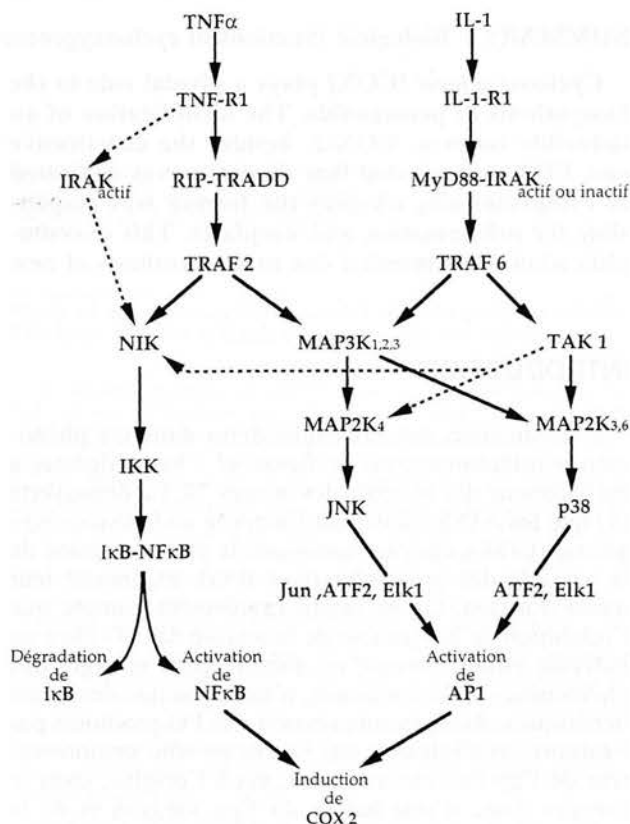


FIG. 1. – Voies de signalisation responsables de l'induction de la COX-2 par le TNF α et l'IL-1.

voque sa dissociation. I κ B est ubiquitiné puis dégradé par le protéasome alors que NF κ B pénètre dans le noyau et induit la transcription. Parallèlement, en aval de TRAF2, par les cascades des *mitogen-activated protein kinases* initiées par MAP3K et MAP2K sont aussi activées les *stress-activated protein kinases*, JNK et p38, qui conjointement contrôlent l'activité du facteur de transcription AP-1 (8).

L'IL-1 elle aussi, active NF κ B et AP-1, mais par une cascade de signalisation différente surtout dans ses premières étapes. La liaison de l'IL-1 à l'IL-1-R1 (*IL-1 receptor*) entraîne l'association de protéines adaptatrices MyD88 et TRAF6 et de l'IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*), puis l'activation de protéines de la famille des MAP3K (9).

DONNÉES RÉCENTES

Après le rappel de la situation, il convient de s'intéresser plus précisément à des résultats récents concernant les relations entre la COX-2 et l'état inflammatoire, les effets des prostaglandines *via* d'autres récepteurs que les récepteurs de la membrane plasmique, les effets des AINS sur d'autres cibles que les COX.

COX-2 et inflammation

Le travail présenté par Gilroy *et al.* (10) apporte des arguments en faveur de la participation de la COX-2 à des processus anti-inflammatoires.

Le modèle biologique consiste en une pleurésie induite par la carragénine chez le Rat. Le pic d'inflammation est atteint à 24 h avec un retour à la normale à 48 h. Jusqu'à 12 h ce sont les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) qui dominent dans les exsudats, puis ils sont remplacés par des cellules mononucléées (MN) qui se différencient ultérieurement en macrophages. L'expression de la COX-2 présente un pic à 2 h puis retourne aux valeurs basales à 24 h pour de nouveau atteindre un pic très important à 48 h (+350 %). L'activité des COX mesurée par la conversion de l'arachidonate en PGE₂, ainsi que la concentration de PGE₂ dans les exsudats suivent le premier pic d'expression de COX-2, mais pas le deuxième. A 2 h, l'inhibition des COX-1 + COX-2 par l'indométacine ou de la COX-2 par le NS-398 diminue de manière dose-dépendante le volume des exsudats et le nombre des cellules inflammatoires (PMN). Par contre, à 48 h, les deux inhibiteurs augmentent de manière dose-dépendante le volume des exsudats et le nombre des cellules inflammatoires (MN), ce qui suggère qu'à ce stade l'activité de la COX-2 est liée à la synthèse de produits anti-inflammatoires tels que la PGJ₂, métabolite de la PGD₂. Le dosage de PGD₂ et de PGJ₂ permet d'observer deux pics, l'un à 2 h, l'autre à 48 h dans les exsudats. Ces pics sont supprimés par les AINS, inhibiteurs des COX. Les effets de cette inhibition de la synthèse des PGD₂ et J₂ endogènes, qui se traduisent par l'augmentation du volume des exsudats et du nombre des cellules

inflammatoires, sont levés par l'addition de PGD₂ ou de PGJ₂ exogènes. Cet article ne propose pas de modèle mécanistique de l'effet anti-inflammatoire, par contre il attire bien l'attention sur le fait que, dans la pratique médicale, il serait préférable de supprimer les traitements par les AINS pendant les périodes de rémission.

Nouveaux mécanismes d'action pour les prostanoides

Le travail présenté par Rossi *et al.* (11) va plus loin que le précédent et se préoccupe d'identifier une nouvelle cible des prostaglandines cyclopenténones, qui serait la sous-unité β de la I κ B kinase (IKK β). L'ensemble des résultats est très convaincant. La plupart ont été obtenus avec la PGA1. L'activation progressive de NF κ B par le TNF α ou par un ester de phorbol (phorbol 12-myristate 13-acétate), ainsi que la très forte augmentation de l'activité de l'IKK qui l'accompagne, sont totalement inhibées par la PGA1. L'effet de la PGA1 n'affecte pas d'autres facteurs de transcription (Oct-1, Sp-1), ni d'autres kinases (JNK, p38). On retrouve cet effet dans différents types cellulaires (*Cos*, *Jurkat*, *HeLa*) avec des cinétiques et des IC₅₀ différentes.

La comparaison des différentes prostaglandines et de l'arachidonate lui-même montre que seules, la PGA1 et la 15-désoxy, Δ 12-14 PGJ₂ inhibent IKK : ces molécules sont les seules à présenter un groupement carbonyle α - β insaturé pouvant réagir avec des nucléophiles tels que des thiols dans la réaction de Michael. L'IKK contient une cystéine (Cys 179), absente dans JNK et p38, qui pourrait jouer ce rôle, car sa mutation en alanine qui n'affecte pas la stimulation par NIK, supprime complètement l'inhibition par la PGJ₂. Le même type de résultats a été obtenu sur des macrophages (12) dont la stimulation par le lipopolysaccharide bactérien (LPS) et l'interféron γ (INF γ) induit l'oxyde nitrique synthase (NOS) : la PGJ₂ inhibe l'IKK et donc la cascade à laquelle participe le NF κ B.

Cette inhibition de l'IKK rappelle des résultats de Yin *et al.* (13) décrivant l'inhibition spécifique de l'activité de l'IKK β par l'aspirine et le salicylate dans les mêmes types cellulaires, mais le mécanisme proposé était différent : il aurait résulté de la compétition du salicylate avec l'ATP sur le site du substrat. Néanmoins, selon des résultats récents, ce mécanisme n'aurait aucune signification biologique et ne serait observable qu'*in vitro* (14). En effet, sur des cellules intactes, le salicylate, par un mécanisme mettant en jeu la MAPK p38, inhiberait l'activité de l'IKK induite par le TNF α , mais pas celle induite par l'IL-1.

Conséquences de l'activation des PPAR sur l'expression de la COX-2

Une autre question importante a été abordée : elle consiste à déterminer si l'activation des proliférateurs de peroxyssomes affecte l'expression de la COX-2. Les travaux dans ce domaine apportent des résultats contradictoires : selon les systèmes, l'effet de ligands potentiels des PPAR est positif ou négatif, ce qui ne permet pas

d'exclure que d'autres voies, non encore identifiées, puissent être impliquées.

Les travaux de Meade *et al.* (15) rapportent que l'expression de la COX-2 par des cellules mammaires (184B5) ou de côlon (CaCo2) est augmentée : – par les acides gras : linoléate, arachidonate, eicosapentaénoate, docosahexaénoate, – par les prostanoides : PGA2, PGD2, PGJ2, PGF2 α , 15-HETE, – par le proliférateur de peroxyssomes : WY-14643, – par les AINS : méfénamate, méclofénamate, NS398, sulfure de sulindac, ibuprofène. Une région du promoteur de COX-2 a été identifiée qui contient un PPRE, indispensable à son activation par le WY-14643.

Les résultats sont interprétés comme résultant de l'activation par ces diverses substances des PPAR α ou δ . Les auteurs attirent l'attention sur les effets cliniques contradictoires des AINS : tant que le traitement est poursuivi, l'induction de la COX-2 n'a pas de conséquences doloisives puisque son activité est inhibée ; par contre, à la fin d'un traitement, les teneurs en COX-2 actives peuvent être augmentées de manière significative, ce qui peut entraîner la synthèse de prostanoides pro-inflammatoires.

Ces résultats sont en contradiction apparente avec ceux rapportés par Staels *et al.* (16). Sur des cellules musculaires, un prétraitement avec des activateurs de PPAR α prévient l'induction par l'IL-1 de la COX-2. Il s'agirait, selon les auteurs, de l'interférence de l'activation de PPAR avec la transcription médiée par NF κ B. Meade *et al.* (15) remarquent que cet effet inhibiteur ne peut résulter de la mise en œuvre du mécanisme classique, car le promoteur de COX-2 utilisé par Staels *et al.* (16) ne contient pas le PPRE.

Un autre travail de Curtis *et al.* (17) décrit l'effet d'acides gras ω -3 dans le milieu de culture de chondrocytes qui se traduit par l'incorporation accrue de ces acides dans les lipides de membrane. Lors d'une stimulation ultérieure par l'IL-1, on observe une diminution de l'activité et de l'expression de l'agrécannase, qui dégrade les protéoglycannes, mais aussi de l'expression de la COX-2, de l'IL-1 α et du TNF α . La culture avec des acides gras saturés, mono-insaturés, poly-insaturés ω -6, ne reproduit pas l'effet des ω -3.

Tous les effets des AINS résultent-ils de l'inhibition des COX ?

Enfin les AINS peuvent avoir d'autres effets que ceux qui résultent de l'inhibition des COX, ce qui complique encore un peu plus la situation (Schéma 2). L'ibuprofène, qui a été décrit par Meade *et al.* (15) comme augmentant l'expression de la COX-2, via les PPAR, a été présenté par Stuhlmeier *et al.* (18) comme un inhibiteur de la dégradation de I κ B α empêchant l'activation de NF κ B et sa conséquence, l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

Dans le même ordre d'idées, il faut signaler la description du caractère pro-apoptotique du Celecoxib, un des meilleurs inhibiteurs spécifiques de l'activité de la COX-2, sur des cellules humaines de cancer de la pros-

tate (19). Cet effet, qui n'est pas reproduit par d'autres inhibiteurs de la COX-2 ou de la COX-1, résulterait du blocage de la phosphorylation et donc de l'activation résultante de la kinase anti-apoptotique Akt.

L'étude d'un modèle d'angiogénèse *in vitro* par Jones *et al.* (20) fournit un autre exemple d'effets des AINS ne résultant pas exclusivement de l'inhibition des COX. En effet l'ajout de prostaglandines exogènes ne corrige pas complètement l'inhibition de l'angiogénèse par des AINS spécifiques de la COX-2 (NS-398) ou non-spécifiques (indométacine). Ces substances inhibent par ailleurs l'activation de la MAPK-ERK2 et sa translocation vers le noyau, sans que le site de leur action soit précisé. Le caractère anti-angiogène des AINS, réputé prévenir les métastases tumorales, peut aussi retarder la cicatrisation des ulcères peptiques.

CONCLUSION

Dans une « hypothèse » publiée par Lancet (21), Willoughby *et al.* suggèrent l'existence d'une COX3 pour rendre compte de leurs résultats (10) où, lors de la résolution de l'inflammation, l'importante expression d'une activité COX paraît associée à la synthèse de PG

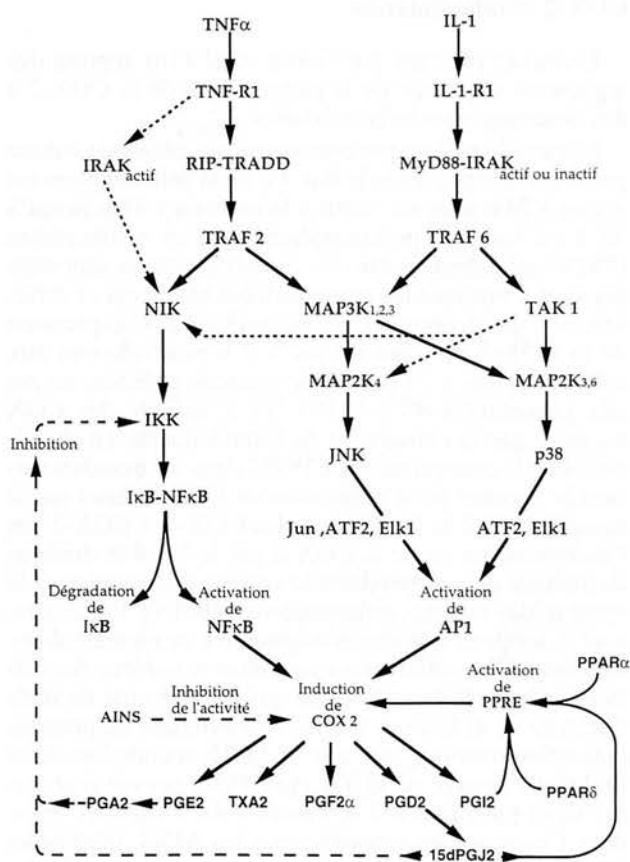


FIG. 2. – Principaux sites de contrôle de l'induction et de l'activité de la COX-2 par les prostanoides et les AINS.

« anti-inflammatoires ». Cette hypothèse ne repose sur aucun argument expérimental supplémentaire; on peut tout autant supposer que les diverses prostaglandines synthétases qui sont exprimées de manière différente dans les divers types cellulaires, soient l'objet d'une régulation concertée avec celle des phospholipases A2 et des COX (Fig. 2).

BIBLIOGRAPHIE

1. Vane J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature New Biol.*, 1971, 231, 232-235.
2. Vane J.R., Bakhle Y.S. & Botting R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998, 38, 97-120.
3. Oshima M., Dinchuk J.E., Kargman S.L., Oshima H., Hancock B., Kwong E., Trzaskos J.M., Evans J.F. & Taketo M.M. Suppression of intestinal polyposis in *Apc³⁷¹⁶* knockout mice by inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 (COX-2). *Cell*, 1996, 87, 803-809.
4. Lim H., Paria B.C., Das S.K., Dinchuk J.E., Langenbach R., Trzaskos J.M. & Dey S.K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 1997, 91, 197-208.
5. Forman B.M., Tontonoz P., Chen J., Brun R.P., Spiegelman B.M. & Evans R.M. 15-Deoxy- Δ -12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*, 1995, 83, 803-812.
6. Forman B.M., Chen J. & Evans R.M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 4312-4317.
7. Kliewer S.A., Sundseth S.S., Jones S.A., Brown P.J., Wisely G.B., Koble C.S., Devchand P., Wahli W., Willson T.M., Lenhard J.M. & Lehmann J.M. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 4318-4323.
8. Stancovski I. & Baltimore D. NF- κ B activation : The I κ B kinase revealed? *Cell*, 1997, 91, 299-302.
9. Ninomiya-Tsuji J., Kishimoto K., Hiyama A., Inoue J-I., Cao Z. & Matsumoto K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signaling pathway. *Nature*, 1999, 398, 252-256.
10. Gilroy D.W., Colville-Nash P.R., Willis D., Chivers J., Paul-Clark M.J. & Willoughby D.A. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Med.*, 1999, 5, 698-701.
11. Rossi A., Kapahi P., Natoli G., Takahashi T., Chen Y., Karin M. & Santoro M.G. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature*, 2000, 403, 103-108.
12. Castrillo A., Diaz-Guerra M.J.M., Hortelano S., Martin-Sanz P. & Bosca L. Inhibition of I κ B kinase and I κ B phosphorylation by 15-deoxy- Δ -12,14-prostaglandin J2 in activated murine macrophages. *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20, 1692-1698.
13. Yin M-J., Yamamoto Y & Gaynor R.B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature*, 1998, 396, 77-80.
14. Alpert D. et Vilcek J. Inhibition of I κ B kinase activity by sodium salicylate *in vitro* does not reflect its inhibitory mechanism in intact cells. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 10925-10929.
15. Meade E.A., McIntyre T.M., Zimmerman G.A. & Prescott S.M. Peroxisomes proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 8328-8334.
16. Staels B., Koenig W., Habib A., Merval R., Lebreu M., Torra I.P., Delerive P., Fadel A., Chinetti G., Fruchart J-C., Nagib J., Maclof J. & Tedgui A. Activation of human aorta smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature*, 1998, 393, 790-793.
17. Curtis C.L., Hughes C.E., Flannery C.R., Little C.B., Harwood J.L. & Caterson B. ω -3 Fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 721-724.
18. Stuhlmeier K.M., Li H. & Kao J.J. Ibuprofen : new explanation for an old phenomenon. *Biochem. Pharmacol.*, 1999, 57, 313-320.
19. Hsu A-L., Ching T-T., Wang D-S., Song X., Rangnekar V.M. & Chen C-S. The cyclooxygenase-2 inhibitor Celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 11397-11403.
20. Jones M.K., Wang H., Peskar B.M., Levin E., Itani R.M., Sarfeh I.J. & Tarnawski A.S. Inhibition of angiogenesis by non steroidal anti-inflammatory drugs : insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nature Med.*, 1999, 5, 1418-1423.
21. Willoughby D.A., Moore A.R. & Colville-Nash P.R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *The Lancet*, 2000, 355, 646-648.