

Université de Montréal

# Réduction des dommages myocardiques par le célécoxib suite à une ischémie transitoire chez le rat

---

par

Laura Lada-Moldovan

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Sciences en Pharmacologie

Novembre, 2009

© Laura Lada-Moldovan, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Réduction des dommages myocardiques par le célécoxib  
suite à une ischémie transitoire chez le rat

présenté par :  
Laura Lada-Moldovan

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur: Jean-Philippe Gratton

Directeur de recherche : Guy Rousseau

Membre du jury : Jean Gino Diodati

## RESUME

Cette étude a été conçue afin d'évaluer l'effet d'un pré-traitement à long terme au célécoxib sur la taille d'infarctus suite à un infarctus du myocarde. Sachant que le célécoxib est un anti-inflammatoire et que des dommages myocardiques peuvent découler des processus inflammatoires, l'inhibition de l'inflammation devrait hypothétiquement réduire la taille d'un éventuel infarctus. Pour ce faire, un traitement au célécoxib (3 mg/kg/jour i.p.) ou au véhicule (DMSO 50% ; EtOH 15% ; eau distillée) a été administré chroniquement pendant 28 jours à des rats mâles Sprague-Dawley (n=18 par groupe) par pompes osmotiques ALZET. Après avoir été anesthésiés, les animaux ont été sujets à l'occlusion de l'artère coronaire gauche descendante, suivie d'une période de reperfusion de 24 heures. Les résultats démontrent que la taille de l'infarctus des animaux traités au célécoxib est significativement réduite comparativement à celle du groupe témoin ( $37,5 \pm 2,5\%$  versus  $48,0 \pm 2,6\%$  de la zone à risque,  $p < 0,05$ ). Par la suite, l'accumulation de neutrophiles indique une hausse de ces leucocytes pour la zone ischémique, sans toutefois discriminer entre les groupes traité et non-traité, qui contenaient aussi les couches sub-endocardique et sous-épicaire. Cependant, aucune différence significative est notée entre les groupes traité et témoin au niveau de l'expression de la prostaglandine E2 plasmatique et du facteur de nécrose tumorale alpha. D'un autre côté, l'apoptose, déterminée par le ratio de Bax/Bcl2 et par un essai TUNEL est significativement réduite pour la couche sub-endocardique de la zone à risque des animaux traités au célécoxib. Enfin, l'agrégation plaquettaire, induite à l'adénosine diphosphate et analysée dans le sang complet, suggère que le célécoxib diminue l'agrégation plaquettaire. Cette étude indique alors qu'un pré-traitement au célécoxib peut réduire la taille d'infarctus par un mécanisme impliquant l'apoptose.

**Mots-clés :** Célécoxib, Infarctus du myocarde, Ischémie, Reperfusion, Agrégation

## **ABSTRACT**

This study was designed to evaluate the effect of long-term pre-treatment with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, on myocardial infarct size. Since celecoxib is an anti-inflammatory and that myocardial damages can be present in the occurrence of inflammatory processes, inhibition of inflammation should hypothetically reduce the size of an eventual infarct. Celecoxib (3 mg/kg/day i.p.) or vehicle (DMSO 50%; EtOH 15%; distilled water) was administered chronically to male Sprague-Dawley rats (n=18 per group) through ALZET osmotic pumps for 28 days. Under anaesthesia, the animals were then subjected to left anterior descending coronary artery occlusion for 40 minutes, followed by 24-hour reperfusion. The results show that myocardial infarct size in celecoxib-treated rats was significantly reduced compared to the control group ( $37.5 \pm 2.5\%$  versus  $48.0 \pm 2.6\%$  of the area at risk,  $p < 0.05$ ). Accumulation of neutrophils, estimated by myeloperoxidase levels, indicated an increase in the ischemic area without any significant difference between groups. No significant difference was observed between the treated and vehicle groups in terms of plasma prostaglandin E2 and tumour necrosis factor-alpha. Apoptosis, evaluated by Bax/Bcl-2 and terminal dUTP nick-end labelled-positive cells, was significantly decreased in the subendocardial layer of the ischemic area in celecoxib-treated rats. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in whole blood suggested that celecoxib diminished platelet aggregation. This study indicates that pre-treatment with celecoxib can reduce infarct size by a mechanism which may involve apoptosis.

**Keywords:** Celecoxib, Myocardial Infarction, Ischemia, Reperfusion, Aggregation

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>x</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xv</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1. Infarctus du myocarde et lésions d'ischémie/reperfusion.....</b>	<b>4</b>
1.1. Ischémie.....	4
1.1.1. Définition.....	4
1.1.2. Pathophysiologie.....	4
1.1.3. Symptômes cliniques.....	5
1.1.4. Traitements.....	6
1.2. Reperfusion.....	7
1.2.1. Neutrophiles.....	8
1.2.2. Plaquettes.....	9
1.2.3. Radicaux libres.....	10
1.2.4. Surcharge calcique.....	10
1.2.5. Apoptose.....	11
<b>Chapitre 2. Le développement d'anti-inflammatoires.....</b>	<b>14</b>
2.1. Glucocorticoïdes.....	14
2.2. AINS.....	15
2.3. AINS sélectifs.....	16
2.4. Risques cardiovasculaires.....	18
<b>Chapitre 3. Hypothèses.....</b>	<b>21</b>
3.1. Hypothèses générales.....	21
3.2. Hypothèses spécifiques.....	24
<b>CONTRIBUTION DES AUTEURS.....</b>	<b>25</b>

<b>Chapitre 4. Chronic pre-treatment with celecoxib reduces infarct size .....</b>	<b>26</b>
4.1. Abstract .....	27
4.2. Introduction .....	28
4.3. Material and Methods .....	30
4.3.1. <i>Materials</i> .....	30
4.3.2. <i>Experimental groups and protocols</i> .....	30
4.3.3. <i>Treatment</i> .....	31
4.3.4. <i>Intraperitoneal insertion of osmotic pumps</i> .....	31
4.3.5. <i>In vivo surgical procedure and heart tissue preparation</i> .....	31
4.3.6. <i>Infarct sizing and area at risk measurements</i> .....	32
4.3.7. <i>Biochemical determinations</i> .....	32
4.3.8. <i>Protein extraction</i> .....	33
4.3.9. <i>Bax/Bcl-2 determinations</i> .....	33
4.3.10. <i>Terminal dUTP nick-end labelling (TUNEL)</i> .....	34
4.3.11. <i>Myeloperoxidase (MPO) activity</i> .....	34
4.3.12. <i>Tumour necrosis factor-alpha (TNF<math>\alpha</math>) determination</i> .....	35
4.3.13. <i>Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) determination</i> .....	35
4.3.14. <i>Platelet aggregation</i> .....	36
4.3.15. <i>Statistics</i> .....	36
4.4. Results .....	37
4.4.1. <i>Infarct size and area at risk</i> .....	37
4.4.2. <i>Neutrophil accumulation</i> .....	37
4.4.3. <i>TNF<math>\alpha</math> and PGE<sub>2</sub> determination</i> .....	37
4.4.4. <i>Evaluation of apoptosis : Bax/Bcl-2</i> .....	38
4.4.5. <i>TUNEL-positive cells</i> .....	38
4.4.6. <i>Platelet aggregation</i> .....	38
4.5. Discussion .....	39
4.5.1. <i>Limitations</i> .....	43
4.5.2. <i>Conclusion</i> .....	43
4.6. Acknowledgements .....	44
4.7. Tables .....	45
4.8. Figures .....	46

4.9. References .....	50
<b>Chapitre 5. Discussion .....</b>	<b>57</b>
5.1. Limitations .....	64
<b>Chapitre 6. Conclusion .....</b>	<b>66</b>
<b>Chapitre 7. Bibliographie .....</b>	<b>67</b>

**LISTE DES TABLEAUX****Table 1. Determination of myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion injury.**

After 40 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion, a significant decrease in the incidence of TUNEL-positive cardiomyocytes was demonstrated in the ischemic region of the subendocardium of the celecoxib group (\*p=0.007). However, no significant difference was observed for the other regions.



## LISTE DES FIGURES

**Figure 1. Determination of infarct size.** After 40 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion, the results show that celecoxib treatment significantly reduces infarct size, expressed in terms of area of necrosis (I) as a percentage of the area at risk (AR) (\* $p < 0.01$  versus controls; mean $\pm$ SEM) (Fig. 1A). However, the AR, expressed as a percentage of the left ventricle (LV), was similar between groups (Fig. 1B) ( $\square$ MI+Control,  $\blacksquare$ MI+Celecoxib;  $n=10$ ).

**Figure 2. Determination of neutrophil accumulation via myeloperoxidase activity.** Neutrophil accumulation, evaluated by myeloperoxidase levels, is significantly increased in the area at risk (AR) compared to the non-occluded area (ANR) (\* $p < 0.05$ ; ANR versus AR ;  $n=9$  in each group; mean $\pm$ SEM). However, no difference is noted between the control and celecoxib-treated groups, when comparing their respective regions.

**Figure 3. Quantification of apoptosis-related proteins during ischemia/reperfusion injury by Western blotting.** Apoptosis, expressed as the ratio of the pro-apoptotic protein Bax and the anti-apoptotic protein Bcl-2, is significantly reduced in the ischemic region of the subendocardium of the celecoxib-treated group (\* $p < 0.05$ ;  $\square$ MI+Control ( $n=9$ ),  $\blacksquare$ MI+Celecoxib ( $n=7$ ); mean $\pm$ SEM). Inset : Representative example of a western blot for Bax and Bcl-2 in the Subendocardium of the area at risk (AR).

**Figure 4. Adenosine diphosphate (ADP)-induced platelet aggregation.** ADP-induced whole blood aggregation, measured by impedance, is significantly reduced in the celecoxib-treated group (\* $p < 0.05$ ;  $\square$ MI+Control ( $n=10$ ),  $\blacksquare$ MI+Celecoxib ( $n=12$ ); mean $\pm$ SEM).

**LISTE DES ABREVIATIONS**

ACTH	Hormone corticotrope
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AINS (NSAIDs)	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
APC	<i>Adenoma Prevention with Celecoxib</i>
Apo/TRAIL	<i>Apo/ TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
APPROVe	<i>Adenomatous Polyp Prevention with Vioxx</i>
ANOVA	Analyse de la variance
ANR	<i>Area not at risk</i>
AR	<i>Area at risk</i>
BID	Deux fois par jour ( <i>bis in die</i> )
CA	Californie
CABG	<i>Coronary Artery Bypass Graft Surgery</i>
CK-MB	<i>Creatine-kinase-muscle-brain</i>
COX	Cyclooxygénase
CLASS	<i>Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study</i>
CRH	Corticolibérine
DFU	5,5-diméthyl-3-(3-fluorophényl)-4-(4-méthylsulphonyl)phényl-2(5H)-furanone
DIE	Une fois par jour ( <i>quaque die</i> )
DMSO	Diméthylsulfoxyde

DR4	<i>Death receptor 4</i>
DR5	<i>Death receptor 5</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	<i>ethylene glycol-bis (beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ECG	Electrocardiogramme
EtOH	Ethanol
Fig.	Figure
FRSQ	Fonds de la recherche en santé du Québec
GI	Gastro-intestinal
GPIIb/IIIa	Glycoprotéine IIB/IIIA
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HO <sup>-</sup>	Anion hydroxyle
I	Zone infarctée
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1
ICAM-2	Molécule d'adhésion intercellulaire-2
IM (MI)	Infarctus de myocarde ( <i>myocardial infarction</i> )
i.p.	Intra-péritonéale

KPO <sub>4</sub>	Phosphate de potassium
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LV	<i>Left ventricle</i>
MA	Massachusetts
MO	Missouri
MPO	Myéloperoxydase
n	Nombre
NaCl	Chlorure de sodium
NaF	Fluorure de sodium
NaPO <sub>4</sub>	Phosphate de sodium
PG	Prostaglandine
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandine I <sub>2</sub>
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PMN	Polymorphonucléée
PMSF	Fluorure de phényl-méthyl sulfoxide
PSGL	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PTCA	<i>Percutaneous transluminal coronary angioplasty</i>
NF-kB	Facteur nucléaire kappa B
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SEM	Erreur type de la moyenne

SMAC/DIABLO	<i>Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with Low pI</i>
SOD	Super-oxyde dismutase
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline-Tween</i>
TID	Trois fois par jour ( <i>ter in die</i> )
TNF $\alpha$	Facteur de nécrose tissulaire alpha
TNF-R55	Récepteur du facteur de nécrose tissulaire
TnI	Troponine I
TnT	Troponine T
Tris	Tris(hydroxyméthyl)amino-méthane
TTC	<i>Triphenyltetrazolium chloride</i>
TUNEL	<i>Terminal dUTP nick-end labelling</i>
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
VIGOR	<i>Vioxx GI Outcomes Research</i>

*Ce travail est chèrement dédié  
à la mémoire de Ioan Moldovan,  
qui m'a enseigné qu'avec persévérance et amour,  
tout est possible.*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Cardinal pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser des études supérieures en pharmacologie auprès du département de médecine de l'Université de Montréal. Sa confiance en mon succès m'a donnée des ailes pour me permettre de m'envoler vers la réalisation de ce projet.

J'aimerais aussi souligner ma gratitude envers le Dr Guy Rousseau, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire au centre de biomédecine de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. Non seulement m'a-t-il transmis sa grande passion pour la recherche, mais il s'est aussi avéré à être un superviseur exceptionnel, et ce, à tous les niveaux. Sa disponibilité et son engagement envers ses étudiants sont des qualités qui s'agencent bien avec sa personnalité. De plus, il est toujours au poste pour déléguer de nouveaux défis, mais aussi pour prêter une oreille attentive et bâtir ainsi une belle complicité avec ses étudiants. Je n'aurais pas pu demander mieux comme superviseur ; mille mercis !

Je tiens aussi à souligner l'implication de Stéphanie-Anne Girard dans ce projet. En l'accompagnant dans ses expériences, j'ai pu entamer mon projet en suivant la trace de ses pas, suite à ses précieuses explications allant de la manipulation des rats à l'exécution des protocoles. Après avoir partagé l'aquarium, ainsi que plusieurs fous rires, une belle amitié s'est développée.

Je voudrais aussi prendre le temps de remercier Sévan Kaloustian et Thierno Madjou Bah, qui ont su me transmettre avec patience leurs savoirs acquis au fil des années passées dans le laboratoire. Les belles conversations philosophiques que nous avons partagées sont aussi un bel souvenir que j'emporte avec moi.

J'aimerais aussi remercier les stagiaires qui ont grandement fait avancer ce projet. En effet, Marc-André Déry, Isabelle Rondeau et Ramy Karam ont fait preuve de grand dévouement envers les tâches attitrées et leur travail s'est accompli de manière impeccable.

Je suis également reconnaissante envers le personnel de l'animalerie du centre de biomédecine. En effet, Pierre Fortier et Caroline Bouchard m'ont grandement aidé avec l'expertise technique dont ils ont fait preuve durant les chirurgies. Je désire aussi souligner l'implication de Louis Chiochio et Sophie Binette pour leur assistance professionnelle dans les soins aux animaux.

J'aimerais aussi porter une attention particulière à Oscar Rivera, qui m'a épaulée et encouragée tout au long de ce projet avec beaucoup d'amour, ainsi qu'à ma famille, qui a toujours cru en moi.

De plus, ce projet n'aurait pu être réalisé sans la contribution financière et matérielle de Pfizer, ainsi que de la part des '*Fonds de la recherche en santé du Québec*', institutions envers lesquelles je suis reconnaissante.

Enfin, merci de tout cœur à tous ceux et celles qui ont fait de ce projet un succès !



## INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires constituent la cause première de mortalité à travers le monde, représentant un total de 17,5 millions de décès annuels [1]. En fait, les maladies cardiaques ischémiques, plus précisément l'infarctus du myocarde, représentent à elles seules 7,6 millions de décès annuels. Elles touchent principalement les hommes pour la catégorie d'âge entre 40 à 70 ans, alors qu'au-delà de cet intervalle, aucune prédisposition liée au sexe n'est établie [2].

Une étude mondiale d'envergure réalisée par le Dr Salim Yusuf en 2004 a démontré que 90% des premières crises cardiaques pouvaient être attribuées à des facteurs de risque tels que la cigarette, un taux anormal de lipides dans le sang (élevé en triglycérides et en LDL ; faible en HDL), l'hypertension artérielle, le diabète, l'obésité abdominale, une consommation quotidienne insuffisante de fruits et de légumes et le manque d'exercice physique [3]. D'autres équipes ajoutent à la liste la défaillance cardiaque, les maladies chroniques rénales, un niveau de stress élevé, l'utilisation de drogues d'abus (telles que la cocaïne) et la consommation excessive d'alcool [4,5]. Cependant, la cause principale demeure l'occlusion d'artères suite à la rupture de plaques athérosclérotiques [2].

Dans des circonstances plus rares, mais tout aussi possibles, la consommation de médicaments d'ordonnance peut aussi être à l'origine de l'augmentation de l'incidence des infarctus du myocarde. Cela s'est avéré à être le cas notamment avec le rofecoxib, un anti-inflammatoire non-stéroïdien (AINS) (Vioxx®, Merck & Co. Inc). En effet, le 30 septembre 2004, lorsque Merck & Co. Inc a annoncé son retrait

volontaire du rofecoxib du marché, une panique générale chez les consommateurs d'AINS s'est installée, de même que parmi les chercheurs impliqués dans la recherche et le développement de ce type de médicaments. Cependant, la nouvelle a aussi énormément contrarié plusieurs patients pour lesquels le rofecoxib était devenu un remède miracle. En effet, contrairement aux autres AINS, le rofecoxib se démarquait par sa sélectivité accrue pour la cyclooxygénase-2 (COX-2), cible de l'inflammation, alors que la COX-1 en était épargnée, ce qui évitait les effets secondaires gastro-intestinaux (GI), tels que les irritations et les ulcères [6].

En 2007, les inquiétudes face à l'utilisation d'AINS sélectifs ne font que fulminer avec le retrait d'un autre AINS sélectif pour la COX-2, soit le lumiracoxib (Prexige®, Novartis), qui était indiqué pour le soulagement des symptômes associés à l'arthrose [7]. Avec le célécoxib (Célébrex®, Pfizer), le seul AINS sélectif encore sur le marché utilisé extensivement pour un spectre de douleurs, telles que l'arthrite, la douleur aiguë ou les douleurs menstruelles, la population ne demande que d'être rassurée [8].

Enfin, la controverse qu'a soulevée l'histoire du rofecoxib est à la base des nombreuses recherches qui ont suivi, afin de valider l'innocuité des AINS, et plus précisément, des inhibiteurs sélectifs de la COX-2, dans le but de justifier leur utilisation avantageuse en tant qu'anti-inflammatoires avec des effets néfastes limités sur le système GI.

Suite à de nombreuses recherches précliniques sur des modèles animaux ou des systèmes isolés, des études ont démontré les effets bénéfiques découlant des anti-

inflammatoires sur la taille de l'infarctus, lorsqu'administrés tôt durant la période de reperfusion suivant un IM [9,10]. D'autres études démontrent même qu'une amélioration de la fonction cardiaque est possible suite à une ischémie, lorsqu'un AINS est administré après la survenue d'un tel évènement [11].

Puisqu'il n'y avait aucune donnée dans la littérature sur l'effet d'un traitement prophylactique et chronique sur la taille de l'infarctus, notre équipe a décidé de s'y pencher. Sachant que des dommages myocardiques déclenchés par la survenue d'un infarctus peuvent découler des processus inflammatoires, l'inhibition de l'inflammation devrait hypothétiquement réduire la taille d'un éventuel infarctus. Ainsi, en intervenant à la source de l'inflammation, soit sur les enzymes COX, il devient intéressant de vérifier cette hypothèse. Afin de valider cette affirmation, le célécoxib est l'agent inflammatoire utilisé dans cette étude, qui est en fait le dernier coxib à demeurer sur le marché et, évidemment, il répond aussi à un besoin croissant de validation supplémentaire dû aux nombreuses controverses ayant surgi au sujet des coxibs.

Paradoxalement, cette étude *in vivo* ne consiste donc pas à évaluer l'incidence de IM suite à l'utilisation chronique de célécoxib, mais plutôt à son effet sur les dommages myocardiques provoqués par une ischémie transitoire chez le rat lorsqu'administré chroniquement et préalablement à un IM.

## **Chapitre 1. Infarctus du myocarde et lésions d'ischémie/reperfusion**

### 1.1. Ischémie

#### *1.1.1. Définition*

L'infarctus du myocarde résulte d'une ischémie, c'est-à-dire d'un apport sanguin à une portion du cœur qui est interrompu, accompagnée d'une oxygénation restreinte. Ce déséquilibre de la balance entre l'apport d'oxygène et la demande du myocarde cause inévitablement des dommages cellulaires ou de la nécrose myocardique (mort des cardiomyocytes), dépendamment de la durée de l'ischémie [2]. Suite à l'infarctus du myocarde, la mort cellulaire peut aussi se présenter sous forme d'apoptose et conduire à des dommages additionnels [12].

#### *1.1.2. Pathophysiologie*

Dans la plupart des cas, la pathophysiologie des infarctus du myocarde est caractérisée par la présence de plaques athérosclérotiques, qui bouchent progressivement les vaisseaux sanguins épicaudiques par l'accumulation graduelle de cholestérol et de tissu fibreux sur les parois d'artères. Ce processus s'amplifie pendant des décennies et l'amincissement du cap fibreux contribue finalement à l'instabilité des plaques. Une fois les plaques rompues, une cascade de coagulation est initiée avec formation de thrombus, bouchant les artères de façon partielle ou complète. Lorsque la thrombogénèse a lieu dans les artères coronaires, un infarctus du myocarde en résulte. Une période d'ischémie s'allongeant de 30 à 40 minutes suffit pour initier la mort de cellules myocardiques, c'est-à-dire de la nécrose. Si

l'apport sanguin est rétabli à l'intérieur des 4 à 6 premières heures par une reperfusion, la prolifération de la nécrose est limitée et les taux de morbidité et de mortalité sont réduits comparativement à une occlusion permanente.

Dans les autres cas, les causes d'infarctus du myocarde sont d'origine non-athérosclérotique. On retrouve dans cette catégorie, les vasospasmes coronaires qui peuvent être causés par l'angine ou par l'utilisation de drogues d'abus, telles que la cocaïne ou l'amphétamine. D'autres pathologies cardiovasculaires telles que les vasculites ou une infection au niveau des valves cardiaques peuvent aussi causer des embolies coronaires. Enfin, tout déséquilibre dans la balance entre l'apport d'oxygène et la demande du myocarde peut entraîner un infarctus du myocarde, de même que les traumatismes au niveau de la poitrine causés par des accidents d'automobile par exemple [2].

Indépendamment si la cause de l'infarctus est d'origine athérosclérotique ou pas, l'ischémie peut s'avérer fatale et conduire à la mort du patient si une portion importante du myocarde est irréversiblement nécrosée [2]. D'un autre côté, si l'infarctus est non-fatal, le patient survivra, mais la cicatrisation du tissu myocardique lésé par l'ischémie le prédisposera à des arythmies (fibrillation ventriculaire) ou à la défaillance cardiaque, deux situations potentiellement mortelles [13].

### *1.1.3. Symptômes cliniques*

Lorsque les symptômes sont remarquables, ils se manifestent progressivement et pendant plusieurs minutes, plutôt que de manière instantanée [14]. Généralement, l'infarctus sera perçu dans 50% des cas comme une douleur aiguë à la poitrine, qui

irradie jusqu'à la mâchoire, au cou, aux bras ou au dos, affectant plus particulièrement le côté gauche [15]. Des malaises tels que des nausées, de l'anxiété, des vomissements, de la toux, de la fatigue, de la faiblesse, des brûlures d'estomac ou de la dyspnée (un manque de souffle) peuvent accompagner la douleur [16].

Cliniquement, 25 % des cas d'infarctus du myocarde passent inaperçus par l'absence de symptômes physiques ou par l'incapacité d'associer les symptômes à l'IM. L'électrocardiogramme est utilisé pour catégoriser le type d'infarctus selon s'il y a ou non élévation du segment ST, afin de déterminer si un traitement de thrombolyse sera administré ou bien si une angioplastie est nécessaire [17-20]. De plus, il est fortement conseillé d'utiliser des méthodes de diagnostic complémentaires, telles que l'évaluation de marqueurs enzymatiques cardiaques présents dans la circulation. En effet, ces tests sanguins évaluant les niveaux de marqueurs, tels que la créatine-kinase-MB (CK-MB) et la troponine I ou T (TnI ou TnT), permettent d'identifier s'il y a nécrose du myocarde

#### *1.1.4. Traitements*

Brièvement, plusieurs classes de médicaments sont utilisées pour le traitement d'un infarctus du myocarde. Elles constituent un cocktail d'antiplaquettaires, d'anticoagulants, d'agents thrombolytiques, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, de bêta-bloqueurs et d'oxygène que l'on administre systématiquement aux patients ayant subi un IM, dans le but de diminuer tout risque de récurrence de thrombus coronaire [15]. De la nitroglycérine et des analgésiques peuvent aussi être administrés. Cependant, il se peut que le patient nécessite aussi des

interventions percutanées ou chirurgicales, telles qu'une angiographie coronaire avec angioplastie (*Percutaneous transluminal coronary angioplasty* ou *PTCA*), une insertion de ballonnets dans les artères coronaires ou un pontage aorto-coronarien (*Coronary Artery Bypass Graft Surgery* ou *CABG*) [15]. Cependant, ces interventions thérapeutiques et chirurgicales seront seulement efficaces à long terme si le patient modifie également son mode de vie et ses habitudes alimentaires.

## 1.2. Reperfusion

Lors d'une ischémie, le fait d'enlever l'occlusion en permettant de nouveau le passage de flot sanguin à travers les vaisseaux est reconnu comme étant une reperfusion [21]. C'est en fait la solution à considérer afin de limiter les dégâts provoqués aux cardiomyocytes durant l'ischémie. Plus la reperfusion est précoce, meilleure sera la proportion de tissu sain, alors qu'une attente trop longue avant de reperfusion conduit à des lésions irréversibles et inévitablement à la nécrose de cellules. Cependant, bien que bénéfique et essentiel, le phénomène de reperfusion met en branle une cascade d'événements conduisant à des lésions de reperfusion [22]. En effet, l'accumulation de leucocytes, de plaquettes, de calcium, de radicaux libres, la libération d'enzymes protéolytiques et des vasospasmes surviennent lors de la reperfusion et s'attaquent aux cellules atteintes de façon réversible, qui possèdent entre autres moins d'oxygène et de réserves énergétiques [22]. Ces cellules affaiblies sont davantage vulnérables à ces agressions et éclateront en leur présence, alors que les cardiomyocytes n'ayant pas subi d'ischémie survivront sous l'influence de ces

agresseurs [22]. Or, en réussissant à contrôler les neutrophiles, les plaquettes, la surcharge calcique, les radicaux libres et l'apoptose survenant durant la reperfusion, la survie des cardiomyocytes sera nettement améliorée, ce qui favorisera une taille d'infarctus considérablement réduite.

### *1.2.1. Neutrophiles*

Selon la littérature, suite à une ischémie du myocarde, les premières heures de reperfusion sont associées à une réponse inflammatoire massive [23]. L'inflammation est tout d'abord caractérisée par une phase d'initiation, durant laquelle il y a dilatation vasculaire qui mène à une perméabilité vasculaire augmentée, puis d'une phase d'amplification. Cette étape particulière coïncide avec la relâche de médiateurs solubles tels que des chimiokines, qui sont responsables de l'activation de l'endothélium et du recrutement de leucocytes [24]. Autres que les cytokines, il y a aussi d'autres facteurs tels que le stress, une blessure ou une infection, qui peuvent recruter des cellules polymorphonuclées (PMN) [25]. Dans les quinze minutes suivant le début d'inflammation, cette augmentation en cytokines mène alors à une infiltration massive et accumulation de neutrophiles. En termes de nombre,  $60 \times 10^6$  neutrophiles sont relâchés dans la circulation à chaque minute [26].

Afin de sortir hors de la circulation, les neutrophiles interagissent avec les cellules endothéliales activées en début de reperfusion par la présence de L-sélectines [25]. Cette margination, de même que le ralentissement des cellules en bordure de la circulation sanguine permet alors le roulement en activant les neutrophiles, ce qui est accompli par l'interaction entre les P-, E- et L-sélectines et leurs ligands [25]. Une



fois les neutrophiles activés, l'étape d'adhésion ferme est ensuite possible lorsque les molécules d'adhésion endothéliales intracellulaires (ICAM-1, -2) se lient aux intégrines B2 des leucocytes [25]. Suite à cela, il y a diapédèse et migration des neutrophiles vers l'espace extravasculaire [25]. Le rôle principal des neutrophiles est la phagocytose, mais aussi l'activation mécanismes subséquents tels que le cycle du monoxyde d'azote et des radicaux libres [25]. Ces mécanismes sont responsables des dommages additionnels causés aux protéines et aux cellules de l'hôte, ce qui mène inévitablement à la mort cellulaire à l'apoptose.

### *1.2.2. Plaquettes*

De concert avec les neutrophiles, les plaquettes sont aussi impliquées dans les lésions d'ischémie/reperfusion. En effet, une étude a démontré que les plaquettes y participaient indirectement par leur capacité à augmenter l'adhésion des neutrophiles suite à l'ischémie et ainsi amplifier les dommages induits lors de la reperfusion par les neutrophiles [27]. En début de reperfusion, les plaquettes sont les premières cellules à être recrutées. De plus, dans les régions infarctées, elles se trouvent à être co-localisées avec les leucocytes, bien que les neutrophiles arrivent plus tardivement [28,29]. Une fois les plaquettes activées soit par le GPIIb/IIIa de la cascade de coagulation ou par la sténose découlant de la restauration du flot sanguin, elles activent l'endothélium, qui à son tour libère des agents pro-thrombotiques [25]. La P-sélectine est ensuite exprimée sur les plaquettes activées, qui pourra se lier au PSGL-1 et interagir avec des lymphocytes-T, des monocytes, des neutrophiles ou avec l'endothélium [30]. L'équipe du Dr Xu a réussi à démontrer que des souris transgéniques génétiquement déficientes pour la P-sélectine présentaient une taille

d'infarctus significativement réduite comparativement au groupe témoin [30]. De plus, ils ont noté que les plaquettes activées s'accumulaient dans la région ischémique de manière proportionnelle à la période correspondant à l'insulte ischémique [30].

### *1.2.3. Radicaux libres*

Un autre facteur responsable des lésions d'ischémie/reperfusion est la production de radicaux libres. En plus de diminuer avec l'âge, les mécanismes endogènes de défense contre les radicaux libres peuvent aussi être débalancés par une ischémie. Par conséquent, une balance s'établit en faveur du stress oxydatif et, une fois la restauration de l'oxygène effectuée, la surcharge en oxygène ne peut être neutralisée et les espèces réactives d'oxygène prennent le dessus et interfèrent avec divers systèmes membranaires [31]. L'oxygène a normalement quatre paires d'électrons. Cependant, lorsqu'un électron n'est plus païré à un autre, il devient instable et porte le nom d'anion superoxyde [31]. Ce dernier peut être dégradé en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par la super-oxyde dismutase (SOD), mais lorsque celle-ci n'est plus fonctionnelle, il peut y avoir la formation d'un anion hydroxyle ( $HO^\cdot$ ) puissamment oxydatif [31]. Ce dernier peut causer des dommages membranaires par l'oxydation des lipides, des dommages à l'ADN ou inactiver des protéines [31]. Dans le cas des cardiomyocytes, cette production de radicaux libres a pour conséquence primaire de modifier l'homéostasie ionique cellulaire, ce qui peut engendrer des instabilités cardiaques [32].

### *1.2.4. Surcharge calcique*

Par ailleurs, lors de l'ischémie et de la reperfusion, une élévation significative des niveaux cytosoliques de calcium a été notée [33,34]. En effet, c'est la présence de radicaux libres induite par l'ischémie qui est responsable du déséquilibre de l'homéostasie ionique cellulaire conduisant à une surcharge calcique. Cette surcharge cause, par exemple, une perturbation des pompes ou des échangeurs de calcium à la membrane, ce qui peut facilement débalancer le calcium cytosolique et affecter les mécanismes de couplage excitation contraction, la matrice extracellulaire ou les protéines contractiles. Par conséquent, la sensibilité contractile des myofibrilles au calcium peut être diminuée et l'activité mécanique peut être découplée [32]. Récemment, Goll et collègues ont démontré entre autres qu'une exposition prolongée à des niveaux élevés de calcium active deux isoformes de calpaïne [35]. Cette enzyme est une cystéine protéase dépendante du calcium qui est néfaste en quantité excessive, car elle amène au développement d'une dysfonction contractile cardiaque [35]. En effet, plusieurs équipes ont observé les effets délétères de cette enzyme protéolytique, dans le processus d'ischémie/reperfusion, notamment au niveau du découplage de l'activité mécanique des cardiomyocytes [36-38].

En d'autres mots, la surcharge calcique stimulée lors de la reperfusion est néfaste puisqu'en plus d'interférer avec des systèmes physiologiques, elle active des enzymes protéolytiques qui causent des lésions au myocarde.

#### *1.2.5. Apoptose*

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui vient au secours des cellules qui sont endommagées de manière irréversible, ou qui contribue tout simplement à se défaire des cellules âgées ou inutiles à l'organisme [39]. Il contribue

ainsi à l'homéostasie des tissus, qu'ils soient adultes ou de nature embryonnaire [40,41]. De plus, certains facteurs paracrines relâchés par les cellules apoptotiques ont été identifiés. Morphologiquement, les cellules entrant en apoptose apparaissent rétrécies et s'adonnent à la fragmentation de la membrane plasmique et du nucléosome, ainsi qu'à la condensation de la chromatine [42]. Les corps apoptotiques sont ensuite digérés par les cellules environnantes ou par les macrophages. Plusieurs stimuli peuvent initier l'apoptose, dont l'hypoxie, mais si ce processus est excessif, comme par exemple dans les cas de cancers, de maladies neurodégénératives ou de l'infarctus du myocarde, il peut mener à des troubles métaboliques, endommageant gravement les tissus touchés, notamment dû à un processus de mort cellulaire programmée déficient [39].

Diverses études ont démontré que différentes protéines étaient impliquées dans l'apoptose, soit par le processus extrinsèque ou intrinsèque. En effet, lorsque son activation implique la voie extrinsèque, un ligand pro-apoptotique (par exemple Fas ou Apo2L/TRAIL) se lie en fait à un récepteur pro-apoptotique (par exemple Fas, DR4 ou DR5), afin de stimuler l'activation des pro-caspases-8 et -10, des protéases enzymatiques intracellulaires, qui, lorsque clivées, deviennent les capsases initiatrices -8 et -10, activant à leur tour les capsases effectrices -3,-6,-7, et menant au processus de mort cellulaire programmée [43]. Quant à la voie intrinsèque, elle est initiée par un stimulus de stress interne résultant d'un dommage à l'ADN, d'une hypoxie ou de la perte de facteurs de survie [44]. Elle fait essentiellement appel aux caspases initiatrices et effectrices pour détruire des protéines cellulaires nécessaires à la survie des cellules en activant, par exemple, des membres de la famille de la protéine pro-

apoptotique Bax [45]. Ces protéines vont ensuite se diriger vers la mitochondrie pour en perméabiliser la surface membranaire via l'inactivation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 [46]. Cette perméabilisation subséquente permet alors au cytochrome c et aux protéines pro-apoptotiques SMAC/DIABLO de se faufiler dans le cytosol mitochondrial pour former l'apoptosome [46]. Finalement, l'activation de la caspase-9 mène ensuite à l'activation des caspases effectrices -3, -6 et -7 [44,46]. Enfin, c'est à ce point de rencontre des caspases que convergent les deux voix [44,46].

## Chapitre 2. Le développement d'anti-inflammatoires

Pour soulager la douleur et l'inflammation, plusieurs classes de médicaments existent. Parmi elles se trouvent les glucocorticoïdes, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), et ceux qui sont davantage sélectifs.

### 2.1. Glucocorticoïdes

Normalement, les glucocorticoïdes sont des hormones endogènes. En situation de stress physique ou psychologique (par exemple en cas de fièvre ou de peur), l'hypothalamus stimule la sécrétion de la corticolibérine (CRH), qui stimule subséquemment les glandes surrénales à produire les glucocorticoïdes par l'intermédiaire de l'hormone corticotrope (ACTH) [47]. Toutefois, il existe des analogues de synthèse des corticoïdes qui constituent la classe de médicaments stéroïdes et ces derniers sont caractérisés par leurs propriétés anti-inflammatoires et anti-immunogéniques [48]. Ils peuvent être utilisés pour prévenir l'exacerbation de la maladie chronique pulmonaire obstructive ou traiter l'asthme, la bronchite, les réactions allergiques ou certaines inflammations au niveau du nez et des yeux [48]. Certains exemples sont la prednisone, la cortisone, la dexaméthasone, la prednisolone, l'hydrocortisone ou la fluticasone [49]. Ces médicaments dérivés des stéroïdes peuvent être pris par voie orale ou par inhalation, ou plus rarement en traitement intramusculaire ou intraveineux, et agissent en diminuant l'inflammation des voies pulmonaires [50]. Bien que très efficaces, ils comportent beaucoup de

risques et d'effets secondaires d'ordre métabolique à prendre en considération. Ils sont notamment reconnus pour affecter plusieurs systèmes physiologiques dû à leur action immunosuppressive et peuvent aussi augmenter les taux du sucre sanguin ou le poids corporel, réduire la densité osseuse et musculaire, causer des cataractes, du glaucome ou une insuffisance adrénargique si un traitement chronique est interrompu de manière soudaine [51]. Ces glucocorticoïdes reposent donc sur le même mécanisme d'action qui constitue le contrôle de l'expression de plusieurs gènes. En effet, les glucocorticoïdes inhibent l'expression de la cyclooxygénase-2, la synthèse de chimiokines ou cytokines pro-inflammatoires (par exemple la cytokine pyrogénique interleukine-1) et aussi le remodelage de la matrice extracellulaire, alors qu'ils induisent l'expression de la lipocortine, qui permettra de réduire la production de prostaglandines et de leucotriènes, par l'inhibition de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) [47]. Néanmoins, la différence entre ces agents est davantage au niveau de la pharmacocinétique, de l'efficacité et de la durée d'action [52].

## 2.2. AINS

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont une classe de médicaments moins puissants que les glucocorticoïdes, spécifiquement dû à leur action limitée sur la production globale des métabolites de l'acide arachidonique. En effet, les AINS inhibent l'activité des cyclooxygénases et empêchent ainsi exclusivement la production de prostanoïdes, alors que les glucocorticoïdes empêchent la production d'éicosanoïdes, tels que les leucotriènes et les prostanoïdes (incluant la prostacycline,

la thromboxane et les prostaglandines), en inhibant l'activité de la lipoxygénase et des cyclooxygénases [47]. Or, bien que présents, les effets secondaires reliés à ces AINS sont moins nombreux. On compte parmi les AINS différentes classes : les salicylates (aspirine et dérivés), les propionates (ibuprofène), les indolacétates (indométhacine) et les para-aminophénols (acétaminophène, qui est en fait l'AINS avec l'activité anti-inflammatoire la moins prononcée) [47]. Ils agissent en empêchant la production des prostaglandines et de la thromboxane du à leur inhibition des deux isoenzymes : les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2). Les effets escomptés incluent des effets anti-inflammatoires, antipyrétiques, antiplaquettaires, mais aussi des effets néfastes sur le système gastro-intestinal via l'inhibition de la COX-1 qui sécrète constitutivement un mucus gastrique protecteur [53]. Les interactions associées à la prise concomitante de médicaments peuvent devenir préoccupantes, car elles pourraient amplifier le risque de saignement avec des anticoagulants ou l'alcool [54].

### 2.3. AINS sélectifs

Les premiers AINS sélectifs pour la COX-2 ont été introduits en 1999, avec l'arrivée du célécoxib et rofecoxib [55]. Cette nouvelle classification distingue les inhibiteurs non-sélectifs ou sélectifs pour la COX-1 (tels que l'aspirine) des inhibiteurs sélectifs pour la COX-2. En effet, les AINS sélectifs pour la COX-2 possèdent l'avantage d'inhiber la douleur et l'inflammation, tout en épargnant les effets secondaires gastro-intestinaux que possèdent les inhibiteurs de la COX-1. En fait, le site actif du



canal de la COX-2 auquel se lie son substrat est plus large que celui de la COX-1, notamment du à une poche latérale supplémentaire qui peut accommoder la liaison de ligands plus volumineux [55]. Cette différence structurale a donc permis le développement de molécules capables d'inhiber la COX-2 avec une affinité supérieure à celle pour la COX-1 [56]. Par leur structure chimique, le sulfure contenant des anneaux de phényle se lie à la poche latérale de la COX-2, mais interagit aussi faiblement avec le site actif de la COX-1 [57]. Ces médicaments sont donc utilisés spécifiquement dans la douleur aiguë ou l'arthrose. Parmi les inhibiteurs de COX-2, on retrouve le lumiracoxib (Prexige), l'étoricoxib (Arcoxia), le rofecoxib (Vioxx), le valdecoxib (Bextra), le parecoxib (une pro-drogue injectable du valdecoxib ; Dynastat) et le célécoxib (Célébrex®), respectivement énumérés par sélectivité décroissante pour la COX-2. Tous ces derniers possèdent un groupement sulfure à l'exception du lumiracoxib. Les différences associées à chacun se situent au niveau de leur structure chimique, de leur sélectivité pour la COX-2 et de leurs propriétés pharmacocinétiques (par exemple la demi-vie) [56]. Cependant, étant donné que l'enzyme COX-2 est impliquée dans plusieurs mécanismes physiologiques, ses inhibiteurs sont déconseillés pour certains patients. Par exemple, puisque la COX-2 favorise la guérison d'ulcères gastroduodénaux, il est fortement déconseillé d'utiliser ce type de médicaments en présence d'ulcères, afin de ne pas empêcher leur cicatrisation [58]. Cependant, à ce jour, le Célébrex® demeure le seul coxib sur le marché. En effet, les autres ont été retirés du marché suite à des effets secondaires graves tels qu'une augmentation du risque cardiovasculaire (rofecoxif,

valdécoxib) ou de toxicité hépatique (lumiracoxib), alors que les autres n'ont pas été approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA).

#### 2.4. Risques cardiovasculaires

Suite à des études indiquant une possibilité de risques cardiovasculaires accrus avec le rofecoxib, Merck & Co. a décidé de retirer volontairement et mondialement ce coxib du marché le 30 septembre 2004. Cependant, il est important de mentionner qu'aucune étude entourant le rofecoxib n'exposait des résultats significativement flagrants, mais bien une tendance vers davantage de risques associés à la prise du médicament lorsque comparé soit à un placebo ou à un AINS non-sélectif. En fait, l'étude VIGOR, qui était destinée à évaluer l'avantage du rofecoxib sur la toxicité GI par rapport aux AINS non-sélectifs, a démontré qu'il y avait une augmentation du risque cardiovasculaire de 1,27% pour le rofecoxib, versus 0,70% pour le naproxen [59]. Suite à cela, l'étude APPROVe, destinée à évaluer l'efficacité du rofecoxib dans la prévention des récurrences des polypes colorectaux, démontrait qu'après 30 mois d'administration, 46 des 1287 patients recevant le rofecoxib avaient été atteints d'un événement thrombotique (3,5%), comparativement à 26 des 1299 patients recevant le placebo (2%) [60]. Un événement thrombotique pouvait être caractérisé par un caillot sanguin, une douleur à la poitrine, une crise cardiaque ou une ischémie cérébrale transitoire ou permanente [61]. Des observations similaires ont aussi été observées avec le valdecoxib [62]. L'hypothèse soutenant ces risques élevés pourrait se baser sur le fait que la COX-2 est l'enzyme responsable, entre autres, de la production de la

prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub> ou prostacycline), qui prévient la génération d'agrégat plaquettaire et qui possède un effet vasodilatateur. Or, l'inhibition de cette prostacycline empêche alors la protection contre les événements thrombotiques [63]. Dans un même ordre d'idées, la COX-1 est une enzyme responsable de la production de la thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), qui est impliquée dans l'agrégation plaquettaire [47]. Donc, le rofecoxib, en plus réduire la production de la prostacycline protectrice de la formation de thrombus, n'exerce pas d'effets sur la COX-1, stimulant ainsi l'agrégation plaquettaire, ce qui favorise en bout de ligne un effet thrombogénique.

Par la suite, des résultats similaires ont été observés avec le célécoxib, ce qui pourrait suggérer un effet de classe. En effet, l'étude Adenoma Prevention with Celecoxib (APC) [64], réalisée dans le but d'évaluer l'efficacité du célécoxib à réduire les récurrences de polypes colorectales, démontrait qu'après une période de 2,8 années d'administration, 2,3% des patients recevant le célécoxib à faible dose, ainsi que 3,4% des patients recevant le célécoxib à haute dose, étaient décédés suite à des événements cardiovasculaires, comparativement à 1% des patients pour le groupe recevant le placebo [61]. Dr Howes s'est penché davantage sur le sujet et a combiné toutes les études réalisées sur les risques cardiovasculaires associés à la prise de célécoxib. En résumé, 10 études avaient démontré que le risque d'incidence d'infarctus du myocarde n'était pas changé par le célécoxib, alors que quatre autres études avaient révélé un risque accru [63]. D'un autre côté, une dernière étude soulignait qu'en présence de célécoxib, le risque d'infarctus du myocarde était significativement réduit [63]. Ces résultats laissent alors suggérer qu'un risque cardiovasculaire est présent, bien que faible, d'où l'importance d'évaluer les risques

y étant associés par rapport aux bénéfices que le célécoxib peut apporter dans l'arthrite chronique ou la prévention du cancer colorectal [61]. D'autre part, le fait que le rofecoxib présente des risques cardiovasculaires plus élevés que le célécoxib laisse suggérer que le rofecoxib aurait une propriété distinctive particulière. Puisque le rofecoxib possède une sélectivité 100 fois plus élevée pour la COX-2 que le célécoxib, des hypothèses suggèrent que les risques cardiovasculaires associés au rofecoxib seraient davantage reliés à cette sélectivité accrue pour la COX-2, mais des preuves supplémentaires demeurent nécessaires [55]. D'autres études proposent aussi que le rofecoxib augmenterait davantage la pression sanguine, ce qui favoriserait la survenue d'évènements cardiovasculaires [65,66]. De plus, Walter et ses collègues suggèrent que l'activité pro-oxydante du rofecoxib puisse favoriser la production de molécules réactives, puis de stress oxydatif, menant inévitablement à des dommages au niveau du LDL-cholestérol, à la formation de plaques athérosclérotiques, qui une fois rompues, causeraient ainsi un thrombus coronaire [67]. Enfin, le fait d'inhiber la COX-2 pourrait aussi être responsable de la réduction de la phase tardive du pré-conditionnement ischémique du myocarde, causant ainsi plus de dommages aux cardiomyocytes. Cependant, cette observation est réalisée autant avec les AINS non-sélectifs que sélectifs [68].

## Chapitre 3. Hypothèses

Cette étude a été conçue dans le but d'évaluer l'effet d'un pré-traitement à long terme au célécoxib, qui est un inhibiteur sélectif de la cyclooxygénase-2, sur la taille d'infarctus suite à un infarctus du myocarde, et de manière à répondre aux différentes hypothèses formulées.

### 3.1. Hypothèses générales

Selon la littérature, l'étape d'amplification cellulaire comprise dans le développement de l'inflammation coïncide avec la relâche de médiateurs solubles, qui sont responsables, entre autres, de recruter les leucocytes. En effet, une augmentation dans le niveau des cytokines favorise une infiltration massive, de même que l'accumulation de cellules polymorphonuclées (PMN) : les neutrophiles. Bien que les neutrophiles soient impliqués dans la phagocytose des intrus, ils sont aussi responsables des dommages infligés aux protéines et aux cellules de l'hôte (tels que la mort cellulaire) par des mécanismes impliquant les voies du monoxyde d'azote et des radicaux libres. Compte tenu de ces faits, l'évaluation de l'accumulation des cellules PMN consiste en un indicateur approprié de la taille de l'infarctus. L'hypothèse générale se présente par le fait que puisque le célécoxib est un anti-inflammatoire, il devrait réduire l'inflammation découlant de l'ischémie, ce qui conduira à une infiltration réduite de neutrophiles. Conséquemment, la réduction des dommages cellulaires escomptés par l'atténuation de l'inflammation par le célécoxib

résultera en une taille d'infarctus réduite. De ce fait, afin de déterminer l'accumulation de cellules PMN, la littérature suggère d'analyser le niveau de l'activité de la myéloperoxydase, puisque les neutrophiles possèdent cette enzyme.

Tel que mentionné précédemment, une augmentation dans le niveau des cytokines est un facteur puissant qui stimule l'accumulation de cellules PMN, ce qui favorise la mort cellulaire, et conséquemment, la taille d'infarctus. Le facteur de nécrose tissulaire alpha (TNF $\alpha$ ), qui est en fait une cytokine inflammatoire, est reconnu pour exercer plusieurs rôles, malgré qu'ils ne soient pas bien documentés. À ce jour, le TNF $\alpha$  est reconnu pour induire la prolifération de neutrophiles lors de l'inflammation, de même de d'induire l'apoptose de neutrophiles lorsque lié au récepteur TNF-R55 [69]. De plus, l'inflammation est induite par le TNF $\alpha$ , par sa stimulation de la COX-2. Des niveaux élevés de TNF $\alpha$  corrélerent même avec des risques accrus de mortalité [70]. Donc, dans cette étude, l'action anti-inflammatoire du célécoxib devrait réduire les niveaux de TNF $\alpha$ , ce qui résulterait en une taille d'infarctus réduite. Toutefois, Kimura et ses collègues affirment que les inhibiteurs de COX-2 n'affectent pas les niveaux de TNF $\alpha$  [71].

Le mécanisme par lequel l'inflammation est initiée fait partie de la voie de l'acide arachidonique. Un stimulus externe active tout d'abord la phospholipase A2 afin d'extraire l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. Conséquemment, l'acide arachidonique est converti en prostaglandines (PG) par les isoenzymes nommées cyclooxygénases (COX-1 et COX-2). Les prostaglandines, plus précisément la PGE<sub>2</sub>, est un puissant vasodilatateur et un médiateur des phases vasculaires de l'inflammation. Pour cette raison, la détermination des niveaux de

PGE<sub>2</sub> est un indicateur important de l'action du célécoxib. Puisque le célécoxib inhibe directement la COX-2, les niveaux de PGE<sub>2</sub> devraient être significativement réduits dans le groupe traité comparativement au groupe témoin.

De plus, plusieurs études sur les inhibiteurs de COX-2, plus précisément avec le rofecoxib, ont démontré que les groupes traités avec l'agent anti-inflammatoire présentaient des risques d'évènements cardiovasculaires augmentés, notamment du à la thrombogénèse. En fait, les inhibiteurs sélectifs pour la COX-2 inhibent la production de prostacycline. Étant donné que ce puissant vasodilatateur (reconnu pour diminuer l'agrégation plaquettaire) n'est plus disponible pour protéger de la formation de caillots sanguins, il y a formation d'un thrombus. Cependant, des résultats similaires, mais non identiques, ont été obtenus avec le célécoxib, qui possède le même mécanisme d'action. Suite aux controverses entourant les inhibiteurs de COX-2, il était donc intéressant d'analyser l'effet du célécoxib sur l'agrégation plaquettaire. Toutefois, plusieurs études soutiennent que le célécoxib n'agit que faiblement sur l'agrégation plaquettaire.

Finalement, la réduction d'apoptose dans le myocarde a aussi été observée avec d'autres inhibiteurs de COX-2 [72], mais les mécanismes d'action ne sont toujours pas élucidés. Néanmoins, des études affirment que la réduction de la taille d'infarctus soit possiblement reliée à la suppression de la voie extrinsèque d'apoptose, soit par une atténuation de l'inflammation [73] ou par une diminution de l'intensité de l'ischémie [74].

### 3.2. Hypothèses spécifiques

En bref, à la fin de cette étude, nous espérons pouvoir confirmer que le groupe traité au célécoxib présente :

1. Une taille d'infarctus significativement réduite, comparativement au groupe témoin, puisque l'atténuation de l'inflammation avec le célécoxib devrait diminuer les dommages infligés aux cardiomyocytes.
2. Un niveau de prostaglandine E<sub>2</sub> significativement réduit, étant donné que le célécoxib inhibe directement la COX-2, qui est nécessaire à la production de prostaglandine E<sub>2</sub>.
3. Un niveau de myéloperoxydase (enzyme exprimée essentiellement par les neutrophiles) significativement réduit, puisque le recrutement des neutrophiles devrait être limité si l'inflammation est inhibée.
4. Aucune variation dans l'agrégation plaquettaire comparativement au groupe témoin, puisque plusieurs études ont démontré que le célécoxib n'a qu'un rôle mineur sur cette variable.
5. Une apoptose réduite, telle que mesurée par les marqueurs pro-apoptotiques (Bax/Bcl-2 et les cellules positives TUNEL), puisque ces mêmes résultats ont déjà été observés dans plusieurs études sur les inhibiteurs de COX-2.



## CONTRIBUTION DES AUTEURS

Laura Lada-Moldovan, Sévan Kaloustian, Thierno Madjou Bah, Stéphanie-Anne Girard, Marc-André Déry, Guy Rousseau (2009). **Chronic pre-treatment with celecoxib reduces infarct size.** (Publication accepted in Journal of Cardiovascular Pharmacology)

Dr Guy Rousseau a réalisé la supervision de ce projet. Il a aussi contribué à ce travail en effectuant l'analyse des données, leur interprétation, ainsi que l'exécution d'analyses ELISA et TUNEL, et en participant à la rédaction du manuscrit, ainsi qu'aux sacrifices.

Sévan Kalousitan, Thierno Madjou Bah et Stéphanie-Anne Girard ont participé à la réalisation de ce projet par leur précieuse aide durant les sacrifices et leur support technique durant les chirurgies.

Marc-André Déry a aussi participé à la réalisation de ce projet en conduisant les expériences de dosage de l'activité de la myéloperoxydase, ainsi qu'à la cueillette et l'analyse de données, et la mise au point de ce protocole.

Quant à ma contribution personnelle, elle se caractérise par l'exécution des protocoles ayant trait à la préparation des traitements, à l'implantation de pompes osmotiques ALZET, aux chirurgies, à l'exécution des essais d'immunobuvardage, à l'analyse et l'interprétation de données, ainsi qu'à la rédaction du manuscrit.

## **Chapitre 4. Chronic pre-treatment with celecoxib reduces infarct size**

### **CHRONIC PRE-TREATMENT WITH CELECOXIB REDUCES INFARCT SIZE**

**Laura Lada-Moldovan, Sévan Kaloustian, Thierno Madjou Bah, Stéphanie-Anne Girard, Marc-André Déry, Guy Rousseau**

<sup>1</sup>Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal and Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

\*Address for correspondence:  
Guy Rousseau, Ph.D.  
Centre Biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal  
5400, boul. Gouin ouest  
Montreal (Québec) Canada H4J 1C5  
Phone: (514)-338-2222, ext. 3421  
Fax: (514)-338-2694

#### 4.1. Abstract

This study was designed to evaluate the effect of long-term pre-treatment with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, on myocardial infarct size. Celecoxib (3 mg/kg/day i.p; n=16) or vehicle (DMSO 50%; EtOH 15%; distilled water, n=16) was administered chronically to male Sprague-Dawley rats through ALZET osmotic pumps for 28 days. Under anaesthesia, the animals were then subjected to left anterior descending coronary artery occlusion for 40 minutes, followed by 24-hour reperfusion. The results show that myocardial infarct size in celecoxib-treated rats was significantly reduced compared to the control group ( $37.5\pm 2.5\%$  versus  $48.0\pm 2.6\%$  of the area at risk,  $p < 0.05$ ,  $n=10$  per group). Accumulation of neutrophils, estimated by myeloperoxidase levels, indicated an increase in the ischemic area without any significant difference between groups. No significant difference was observed between the treated and vehicle groups in terms of plasma prostaglandin E<sub>2</sub> and tumour necrosis factor-alpha. Apoptosis, evaluated by Bax/Bcl-2 and terminal dUTP nick-end labelled-positive cells, was significantly decreased in the subendocardial layer of the ischemic area in celecoxib-treated rats. This study indicates that pre-treatment with celecoxib can reduce infarct size by a mechanism which may involve apoptosis inhibition.

**Keywords:** Ischemia, Reperfusion, Celecoxib, Myocardial infarction, Aggregation

## 4.2. Introduction

Cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective inhibitors are commonly known to offer the beneficial anti-inflammatory properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), but without gastrointestinal side-effects [6].

Celecoxib, a COX-2-selective inhibitor, has been shown to reduce prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), inflammation, brain oedema and perihematomal cell death [75,76]. Furthermore, previous experimental studies have implicated it in the attenuation of symptoms associated with major depression models [77-79]. Other investigations have demonstrated the anti-oxidative and antimutagenic properties of this selective NSAID [80-83].

Experiments indicate that COX-2 is involved in the cardioprotection offered by ischemic pre-conditioning, a powerful endogenous mechanism [84]. According to the current consensus, early ischemic preconditioning (few minutes before occlusion), is mediated by the activation of kinases, whereas late preconditioning (>12 hours before occlusion) is conferred by the induction of novel proteins, such as COX-2 [85]. Thus, inhibition of COX-2 reduces the benefits of late preconditioning, supporting a detrimental situation.

In contrast, it has been shown that the first hours of reperfusion are associated with a massive inflammatory response as measured by neutrophil accumulation in the ischemic myocardium [86]. Consequently, the attenuation of neutrophil accumulation in the ischemic myocardium, may result in a significantly reduced infarct size [87]. According to these mechanisms, we suggest that inhibition of the neutrophil

accumulation with celecoxib, as assessed by myeloperoxidase activity, could diminish the additional myocyte damage that arises during the inflammatory phase of reperfusion. On the other hand, it has been shown that platelets accumulate in the ischemic myocardium [88] and that activated platelets can be deleterious for the ischemic myocardium [89,90] suggesting that Coxibs, due to prothrombotic properties [60], may alter myocardial infarct size through the activation of platelets.

Celecoxib may also modulate the number of cells dying from apoptosis. While a study indicates that celecoxib reduces apoptosis [78], others claim an increase of apoptosis [91]. Apoptosis contributes to the infarct size since its inhibition leads to a significant reduction of infarct size [92,93]. The potential effect of celecoxib on apoptosis must be an important mechanism to explain its effect on infarct size.

With retrieval of the COX-2-selective inhibitor rofecoxib, controversies surrounding the use of NSAIDs have raised many concerns regarding the increased incidence of cardiovascular events. Patients are faced with greater risks of thrombogenesis and, more precisely, with myocardial infarctions (MIs) and strokes [60,94].

Interestingly, no studies have determined the effect of pre-treatment with a COX-2 inhibitor before the onset of myocardial ischemia on MI size.

Therefore, in the present study, we hypothesize that chronic treatment with celecoxib will result in a smaller infarct size by a mechanism involving a reduction of neutrophil accumulation and apoptosis in the ischemic myocardium.

### 4.3. Material and Methods

#### 4.3.1. *Materials*

The various chemicals used in this experiment were obtained from different suppliers. Anti-phospho-Akt (#9271), anti-Akt (#9272), anti-rabbit (#7074) antibodies: Cell Signaling (Beverly, MA); anti-Bax (B-9, sc-7480) and anti-Bcl-2 (C-2, sc-7382): Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); Tween 20: Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Quebec, Canada); dimethylsulfoxide (DMSO), Tris(hydroxymethyl)amino-methane (Tris) and sodium chloride: Laboratoire MAT (Beauport, Quebec, Canada); Lowry protein assay reagents: Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA); enhanced chemiluminescence reagents: PerkinElmer Life Sciences (Markham, Ontario, Canada); terminal dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay kit: Oncogene (La Jolla, CA); Model 2ML4 ALZET osmotic pumps (Cupertino, CA); propidium iodide: Calbiochem (537059, San Diego, CA). Celecoxib was generously provided by Pfizer (Montreal, Quebec, Canada). All the other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

#### 4.3.2. *Experimental groups and protocols*

All procedures involving animals were conducted with the approval of the local Animal Care Committee. Male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Saint-Constant, Quebec, Canada), weighing 325-350 g, were randomly assigned to 1 of 2 distinct groups. The control group (n=18) received the vehicle, and the experimental group (n=18) was given celecoxib (3 mg/kg/day i.p.) continuously through ALZET osmotic pumps 28 days prior to occlusion.

#### 4.3.3. *Treatment*

Celecoxib was administered i.p. through ALZET osmotic pumps in accordance with the manufacturer's instructions. All steps were carefully undertaken in a sterile environment. Briefly, the vehicle (DMSO 50%; EtOH 15%; distilled water) and celecoxib (3 mg/kg/day) diluted in the vehicle were prepared. With a syringe attached to a filling tube at its extremity, a corresponding solution was delivered at room temperature into the pump reservoir, after which a flow moderator was installed.

#### 4.3.4. *Intraperitoneal insertion of osmotic pumps*

Once the rats were anaesthetized with ketamine-xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg i.m.), the implantation zone was shaved and sanitized with iodine. A midline skin incision (1 cm long) was made on the lower abdomen under the rib cage. While carefully lifting the musculo-peritoneal layer to avoid damage to the bowel, the peritoneal wall was incised directly beneath the skin incision. A pump filled with the respective solution was inserted into the peritoneal cavity with the delivery portal first. The musculo-peritoneal layer was closed with 2.0 silk sutures, taking care to avoid bowel perforation. The skin incision was closed with 3.0 sutures.

#### 4.3.5. *In vivo surgical procedure and heart tissue preparation*

Rats were anaesthetized with ketamine-xylazine (50 mg/kg and 5 mg/kg i.m.) and maintained with isoflurane (1%). They were then intubated and connected to a ventilator to monitor their respiration. Electrodes placed on their paws recorded ECG and heart rate. A left thoracotomy was performed, and the left anterior descending coronary artery was occluded by a 4.0 silk suture with a plastic snare. Ischemia was

confirmed by ST segment alterations and ventricular subepicardial cyanosis. After 40 minutes of occlusion (ischemia), the ligature was loosened so that the myocardial tissue could be reperfused. Reperfusion was confirmed by the disappearance of cyanosis; the thorax was closed after 15-30 min of reperfusion, and the animals were returned to their cages after receiving an antibiotic (15,000 IU penicillin G, i.m.) and an analgesic (2 mg/kg of butorphanol, s.c.).

#### *4.3.6. Infarct sizing and area at risk measurements*

The rats were sacrificed after 24 hours of reperfusion, and their hearts were promptly removed to evaluate infarct size. First, blood was washed away with saline by cannulation of the aorta. Then, the left anterior descending coronary artery was occluded at the original site. Evans Blue (0.5%) was infused in the heart through the aorta to assess the area at risk (AR). The heart was then frozen for 5 minutes at -80°C. Four 2-mm transverse slices were cut and dipped in a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (1%, pH 7.4) for 10 minutes to measure the area of necrosis (I). MI size was expressed as a percentage of necrosis over the AR (I/AR). Furthermore, the AR was expressed as a percentage of the left ventricle (LV) area (AR/LV). In terms of appearance, assessment of each area was achieved through morphological properties intensified with TTC treatment. For instance, the area of necrosis appears white, whereas the area at risk appears red. Evans Blue also identifies the area spared from ischemia, which is represented in blue.

#### *4.3.7. Biochemical determinations*



Infarct size was not measured in a subgroup of rats (n=8). Instead, the myocardium was separated into the ischemic (AR) and non-ischemic (area not at risk, ANR) regions. Each region was further divided into subendocardial and subepicardial regions. As no coloration was made for the dissection of the myocardium, the inferior half of the myocardium layer was defined as subendocardial region and the upper part of the myocardium wall was defined as subepicardial. The tissues were rapidly snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until required.

#### *4.3.8. Protein extraction*

The protein extraction procedure was performed as described previously [95]. Heart tissues were homogenized by sonication in mitogen-activated protein kinase lysis buffer (50 mM Tris (pH 7.5), 20 mM B-glycerophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin, 5 mM DTT, 1 µM microcystin LR, and 1% Triton X-100). After incubation at 4°C for 30 minutes, the homogenate was centrifuged for 15 minutes at 10,000g, and the supernatants were then collected for protein measurements by the Lowry method.

#### *4.3.9. Bax/Bcl-2 determinations*

Aliquots of 100 µg protein were loaded on 10-15% polyacrylamide gel, and electrophoresis was conducted in a mini-gel apparatus (Bio-Rad Laboratories). Proteins were transferred to Protran nitrocellulose membranes (Mandel, Montreal, Quebec, Canada) with a Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell (Bio-Rad Laboratories). Dyeing with Ponceau Red S confirmed the adequacy of protein

transfer. Nonspecific sites were blocked with 5% non-fat dry milk diluted in TBS-T (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20), and the membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody (diluted 1:500 (Bax, Bcl-2)) in 5% non-fat dry milk in TBS-T). They were then washed, and the secondary antibody (diluted 1:5,000 (anti-rabbit) in 5% non-fat dry milk in TBS-T) was added before incubation for 45 minutes at room temperature.

The membranes were washed, and chemiluminescence reagents were added prior to exposure on scientific imaging film (PerkinElmer Life Sciences) or on Kodak ImageStation 440CF. Band intensities were analyzed with Kodak 1D v.3.5.5 Scientific Imaging software. The same membrane was stripped (0.1 M glycine, 1% SDS, pH 2.0, for 1 hour at room temperature) and reprobed with subsequent primary antibody for ratio assessment.

#### *4.3.10. Terminal dUTP nick-end labelling (TUNEL)*

TUNEL staining was undertaken as described previously, in keeping with the manufacturer's protocol. Cryostat sections were fixed in paraformaldehyde (4%) and rinsed. Sections were permeabilized and, after washing, the labelling reaction was performed for 1 hour at 37°C. The reaction was stopped, and all nuclei were stained with propidium iodide (1 µM). The samples were viewed under a Leica epiillumination microscope. All sections were photographed at the same magnification (400X) with a Nikon Coolpix 995 camera.

#### *4.3.11. Myeloperoxidase (MPO) activity*

Neutrophil accumulation in cardiac tissue was evaluated by measuring MPO activity. Cardiac tissue samples (100 mg/mL) were taken from ischemic and non-ischemic regions of the rat myocardium, minced on ice, suspended in extraction buffer (50 mM KPO<sub>4</sub>, 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide, pH 6.0) and sonicated. The homogenates underwent 3 freeze-thaw cycles and were further sonicated before centrifugation (15 minutes, 40,000g, 4°C). The supernatants were kept and their protein contents were assayed with a DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories), according to the manufacturer's instructions. Enzymatic assay was performed by adding (1:30) the supernatants to a reaction buffer (50 mM NaPO<sub>4</sub>, 0.167 mg/mL o-Dianisidine, 0.0005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 6.0). The reaction was monitored with a spectrophotometer by measuring absorbance (460 nm) every 10 seconds for 2 minutes. The results were expressed in terms of increased optical density per minute per mg of protein.

#### *4.3.12. Tumour necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) determination*

TNF $\alpha$  was quantified by immunoassay with the Invitrogen Multiplex Kit as per the manufacturer's instructions (LRC0002, BioSource, Carlsbad, CA). Plasma samples of 100  $\mu$ L were prepared and 50  $\mu$ L of biotin conjugate were added. The mixture was incubated for 2 hours at room temperature. After washing, 100  $\mu$ L of Streptavidin-HRP were included along with the working solution, and incubated for 30 minutes. After additional washing, 100  $\mu$ L of stabilized chromogen were added. Subsequently, 100  $\mu$ L of Stop Solution ended the reaction, and absorbance was measured at 450 nm.

#### *4.3.13. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) determination*

PGE<sub>2</sub> levels were quantified by Enzyme Immunoassay (EIA) in accordance with the manufacturer's instructions (514010, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). First, reagents were added to corresponding wells in this order: 100 µl of EIA buffer, 50 µl of PGE<sub>2</sub> Express Standard, 50 µl of each sample, 50 µl of PGE<sub>2</sub> Express Acetylcholinesterase Tracer and 50 µl of PGE<sub>2</sub> Express Monoclonal Antibody. The plates were incubated for 60 minutes at room temperature on an orbital shaker and further developed, using 20 µl of Ellman's reagent. Absorbance was measured between 405 and 420 nm.

#### *4.3.14. Platelet aggregation*

In order to determine if celecoxib has prothrombotic effect, platelet aggregation was measured with a whole-blood aggregometer (Chronolog® Model#540VS; Chronolog Corp.(Havertown, PA). Five hundred µl of blood were diluted 1:1 with saline (0.9%). The mix was then stirred at 37°C for 1 minute before the addition of 40 µM of adenosine diphosphate (ADP). Platelet aggregation was recorded during the following 5 minutes, and maximal intensity was reported in ohms.

#### *4.3.15. Statistics*

The results were expressed as mean ( $\pm$  standard error of the mean). The neutrophil data were analyzed by 2x2x2 factorial ANOVA (group X region X layer). TUNEL staining data were evaluated by the  $\chi^2$  statistical test. All other data were analyzed by student's t-test.  $p < 0.05$  was considered significant.

## 4.4. Results

### 4.4.1. *Infarct size and area at risk*

Celecoxib induced a 22% reduction in infarct size compared to the control group (controls (n=10):  $48.0 \pm 2.6\%$ ; celecoxib-treated rats (n=10):  $37.5 \pm 2.5\%$ ;  $p < 0.01$ ), indicating that pre-treatment with celecoxib diminished the damage evoked by ischemia. No significant difference was observed between groups for the AR expressed as a percentage of the LV (Figure 1).

### 4.4.2. *Neutrophil accumulation*

In order to evaluate the anti-inflammatory effect of celecoxib, we measured the neutrophil accumulation in the different regions of the myocardium as well as the plasma levels of  $\text{TNF}\alpha$  and  $\text{PGE}_2$ . Significant neutrophil accumulation was observed in the ischemic region of the heart, when compared to the non-occluded region, regardless of the treatment received ( $p < 0.01$ ; Figure 2). However, no significant difference was apparent between the 2 treatments in the different layers of the ischemic myocardium, indicating that celecoxib had no influence on neutrophil accumulation.

### 4.4.3. *$\text{TNF}\alpha$ and $\text{PGE}_2$ determination*

Effects of celecoxib on two circulating inflammatory molecules were also assessed by ELISA on plasma samples. Plasma samples at sacrifice showed a minor but not significant decrease of plasma  $\text{TNF}\alpha$  levels ( $6.3 \pm 0.5$  pg/mL in the control group versus  $4.9 \pm 0.6$  pg/mL in the celecoxib-treated group (n=15 in each group). Moreover,

plasma PGE<sub>2</sub> levels were not different between the 2 groups: 635.2±35.4 pg/mL in the controls (n=13) versus 652.5±45.5 pg/mL in celecoxib-treated rats (n=15).

#### 4.4.4. *Evaluation of apoptosis : Bax/Bcl-2*

Apoptosis in the myocardium was evaluated by two different techniques: Bax/Bcl-2 ratio and TUNEL-positive cells. The Bax/Bcl-2 ratio, obtained by Western blotting, revealed a significant decrease in the celecoxib-treated group, in the subendocardial region of the AR (controls (n=9): 100.0±14.7; celecoxib (n=7): 51.3±15.0; p<0.05; Figure 3). All other regions showed no significant difference between the 2 groups, suggesting a regional effect of celecoxib on the myocardium.

#### 4.4.5. *TUNEL-positive cells*

Isolated hearts presented a significant decrease in counted TUNEL-positive cells in the subendocardial region of the AR (controls: 18/4406; celecoxib: 7/5820; p=0.007, Table 1). No significant difference was detected in the other regions. These results confirm the celecoxib-induced reduction of apoptosis in the subendocardial layer of the ischemic region.

#### 4.4.6. *Platelet aggregation*

Platelet aggregation was estimated in whole blood by the impedance technique. Celecoxib treatment significantly reduced ADP-induced platelet aggregation by 47% compared to the control group (Figure 4).

#### 4.5. Discussion

The results of infarct size determination indicate a significant 22% decrease in the celecoxib-treated group. The data contrast with those we obtained in a previous study where we observed that celecoxib, administered 10 minutes after the onset of reperfusion, had no effect on MI [78]. The difference between the effects of celecoxib on MI sizes in these two studies suggests that treatment timing relative to ischemia is important; only celecoxib before the onset of reperfusion seems to be able to reduce myocardial damage evoked by ischemia. Similarly, in a prior study, we noted that an  $A_{2A}$  agonist, CGS21680, was capable of diminishing infarct size when it was given 5 minutes before the onset of reperfusion, in contrast to the effect seen when the agonist was delivered after reperfusion onset [96]. These results indicate 2 different unanswered possibilities: 1. the regimen should be more aggressive to rapidly reach an effective plasma concentration, and 2. drugs after the onset of reperfusion have minimal action.

Beneficial cardiac outcomes of COX-2 inhibitors have also been documented in different studies [9,10]. DFU, a COX-2 inhibitor, when administered 30 minutes prior to the ischemic period and continued for 3 months, was found to significantly reduce infarct size compared to a control group. In the same experimental series, aspirin at high or low doses had no effect on infarct size [9], suggesting that COX-2 has a deleterious influence on the myocardium during ischemia. In patients with elective percutaneous coronary intervention for stable angina pectoris, celecoxib treatment 7 days earlier significantly decreased the markers of myocardial injury [10], which emphasizes its beneficial impact on ischemic cardiomyocytes.

According to its anti-inflammatory properties, we suspected that celecoxib could reduce neutrophil accumulation in the ischemic myocardium. Neutrophils accumulate rapidly and massively in the AR during the first hours of reperfusion (<24 hours) [86]. This accumulation is concordant with increased infarct size [86]. Furthermore, diminution of neutrophils through different interventions results in smaller infarct size, although controversy still surrounds their role [97]. In our study, we observed that neutrophil accumulation is higher in the AR compared to the non-ischemic region. These data are consistent with the literature, suggesting that leucocyte recruitment to damaged tissues is part of the inflammatory process [98]. No significant difference was apparent between the treated and untreated groups, indicating that the beneficial effect of celecoxib is not related to inhibited neutrophil accumulation. In some circumstances, COX-2 suppression has been associated with increased neutrophil migration [99], suggesting that COX-2 activation could result in reduced neutrophil migration. Despite the absence of effects on migration, other functions assigned to neutrophils can be inhibited by celecoxib, such as cytokine production [71]. Indeed, it has been demonstrated that COX-2 inhibition decreases the release of pro-inflammatory cytokines mediated by interleukin-1 $\beta$  from activated neutrophils [71].

As opposed to our expectations, the data on PGE<sub>2</sub> did not show any difference between the 2 groups. In theory, direct COX-2 inhibition necessarily hinders the conversion of arachidonic acid to PGH<sub>2</sub>, which cannot be further transformed into PGE<sub>2</sub>, thus decreasing PGE<sub>2</sub> levels [100]. However, the fact that PGE<sub>2</sub> can also be produced by COX-1 [101,102] suggests that other sources may overcome the effect



of celecoxib on PGE<sub>2</sub> generation. A second alternative relies on the fact that PGE<sub>2</sub> levels were assessed from plasma samples obtained at the moment of sacrificing the animals. Since our animal model undergoes a period of 24 hours of reperfusion without drug administration, celecoxib levels might be left in such small proportions as compared to when last administered, that the remaining active dose cannot affect PGE<sub>2</sub> levels any longer. Indeed, on the 28<sup>th</sup> day of treatment, when ischemia is scheduled, since the half-life of celecoxib is of 11 hours, the minimal effective concentration is still present (100 mg) during reperfusion period [109]. However, on the 29<sup>th</sup> day of protocol, when sacrifice of rats is performed, this minimal effective concentration is no longer present so PGE<sub>2</sub> levels are no longer representative, which explains why no difference is observed between the treated and untreated groups. In a future study, dosage of inflammatory markers at various moments during treatment could be indicative of PGE<sub>2</sub> levels and continuing infusion of celecoxib until sacrifice would also be a point to consider.

No significant differences were detected in plasma TNF $\alpha$  concentration between the 2 groups. It has been observed that COX-2 inhibitors affect the production of pro-inflammatory cytokines by neutrophils, with the exception of TNF $\alpha$  [71] by an unknown mechanism. These results indicate that TNF $\alpha$  plays no role in the cardioprotection provided by celecoxib.

Another beneficial outcome in the celecoxib group was apoptosis reduction in the subendocardial layer of the ischemic region. Heart tissue analysis of the ratio of the pro-apoptotic protein Bax and the anti-apoptotic protein Bcl-2 showed a significant decrease of apoptosis in the ischemic subendocardium of the celecoxib-treated group.

These findings are consistent with results obtained by TUNEL assay, where a significant diminution of TUNEL-positive cells was observed in the celecoxib-treated group for the same occluded region of the subendocardium. Reduced apoptosis has also been documented with other COX-2 inhibitors in the myocardium [72]. The mechanism remains unknown but could be related to suppression of the extrinsic signalling pathway of apoptosis through either attenuation of inflammation [73] or decreased ischemia intensity [74]. The second hypothesis is interesting since apoptosis reduction is localized in the subendocardium, the region most susceptible to hypoxia [103]. Our study was not designed to answer this question, so further experiments are needed to clarify this issue.

Platelet aggregation showed a 47% decrease in the celecoxib-treated group. Various published data have indicated that celecoxib has a minor effect on platelet function [104-106]. In one of these studies [105], 14-day treatment had no significant effect on platelet aggregation, whether it was induced by collagen or arachidonic acid. Technical approaches to evaluate platelet aggregation may explain the discrepancies between these results [107]. It has been demonstrated that the whole blood aggregation method appears to be more sensitive in detecting inhibition compared to the platelet-rich plasma technique.

The diminution of platelet activation in the celecoxib group can explain the beneficial effect on infarct size. Indeed, it has been observed that activated platelets have deleterious effect on myocardial infarct size by an undefined mechanism [89]. Reduction of platelet aggregation indicates that celecoxib could have a beneficial

effect on infarct size by a mechanism involving platelet function. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

Chronic celecoxib treatment could attenuate the expression of different molecules by inhibiting their regulation, through NF- $\kappa$ B, for example. Indeed, it has been shown that celecoxib inhibits TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation at the level of its nuclear translocation [108] and can compromise the expression or synthesis of molecules involved in platelet aggregation. However, further studies are required to elucidate the mechanism of action.

#### *4.5.1. Limitations*

One limitation of the study is that biochemical measurements were made in subendocardial and subepicardial layers regardless of the myocardial infarction localization because determination of infarct size can alter biochemical measurements [96].

Another limitation of this study is the lack of assessment of celecoxib stability in the osmotic pump after 28 days. However, since we observed a significant reduction of MI, subendocardial apoptosis and platelet aggregation, we believe that there is enough active compound at 28 days to induce beneficial effects.

#### *4.5.2. Conclusion*

The presence of celecoxib prior to MI results in smaller infarct size, decreased apoptosis in the ischemic subendocardium and diminution of platelet aggregation induced by ADP in rats.

#### 4.6. Acknowledgements

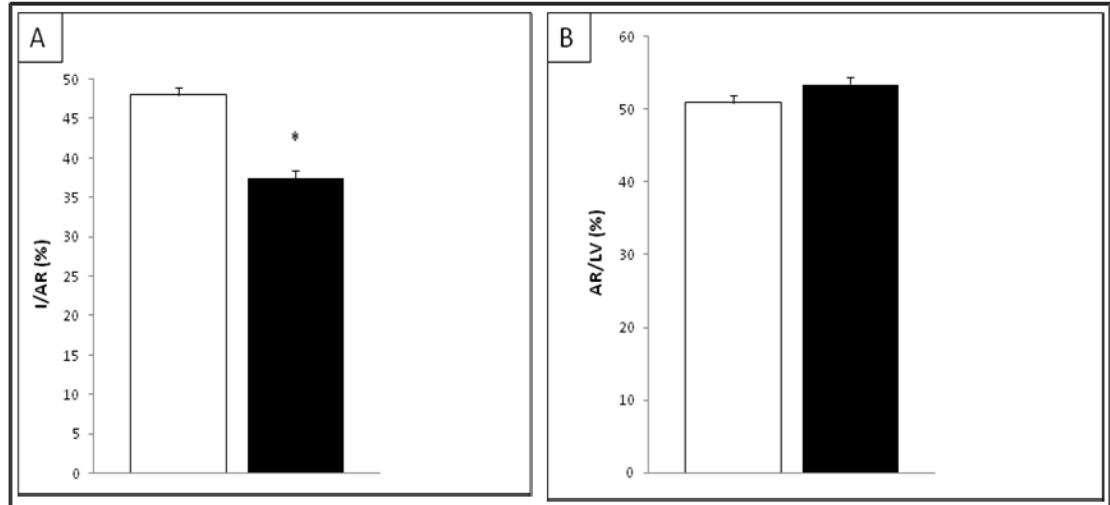
We thank Pierre Fortier and Caroline Bouchard for their technical support with rat surgeries and for their field expertise as well as Louis Chiochio and Sophie Binette for their professional assistance in animal care. We are indebted to Ramy Karam and Isabelle Rondeau for their valuable involvement in this study. We also thank Pfizer for generously providing celecoxib. G.R. is a scholar of “*Fonds de la recherche en santé du Québec*” (FRSQ). M.T.B. and S.K. hold studentships from the FRSQ.

## 4.7. Tables

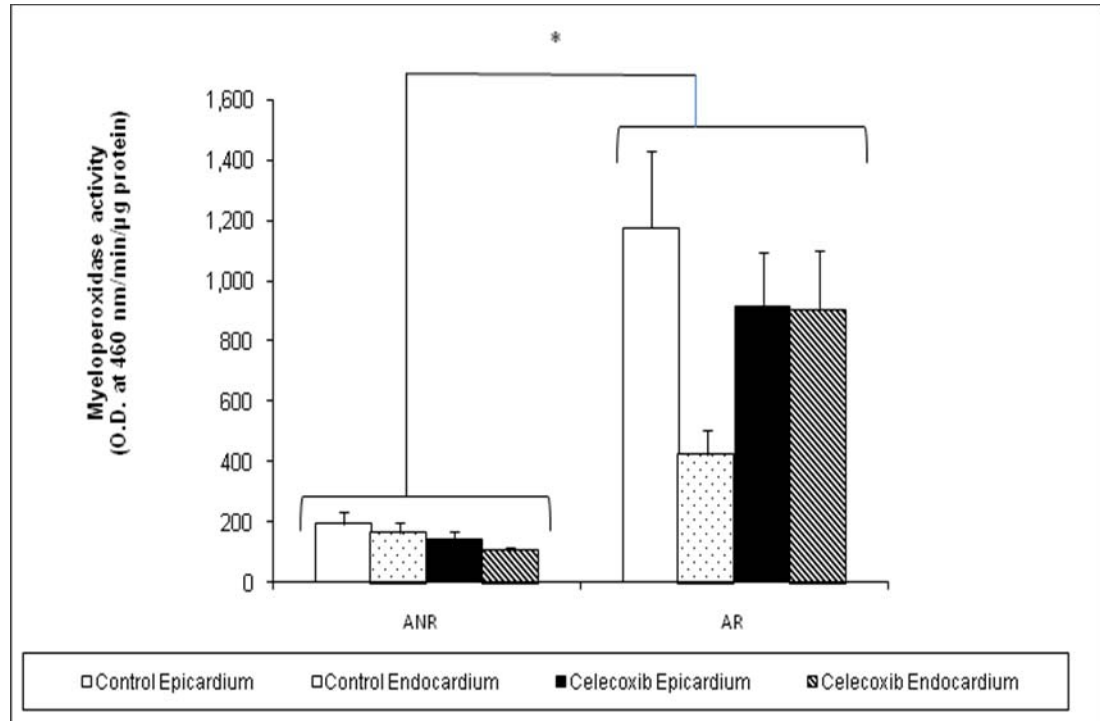
**Table 1. Determination of myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion injury.** After 40 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion, a significant decrease in the incidence of TUNEL-positive cardiomyocytes was demonstrated in the ischemic region of the subendocardium of the celecoxib group (\*p=0.007). However, no significant difference was observed for the other regions.

		TUNEL-positive cells	Total	% of positive cells
<b>Control</b>	<b>AR endocardium</b>	<b>18</b>	<b>4,406</b>	<b>0.409</b>
	<b>AR epicardium</b>	<b>16</b>	<b>6,352</b>	<b>0.252</b>
	<b>ANR endocardium</b>	<b>4</b>	<b>3,982</b>	<b>0.100</b>
	<b>ANR epicardium</b>	<b>4</b>	<b>4,036</b>	<b>0.099</b>
<b>Celecoxib</b>	<b>AR endocardium</b>	<b>7</b>	<b>5,820</b>	<b>0.120*</b>
	<b>AR epicardium</b>	<b>18</b>	<b>6,732</b>	<b>0.267</b>
	<b>ANR endocardium</b>	<b>7</b>	<b>6,193</b>	<b>0.113</b>
	<b>ANR epicardium</b>	<b>9</b>	<b>8,105</b>	<b>0.111</b>

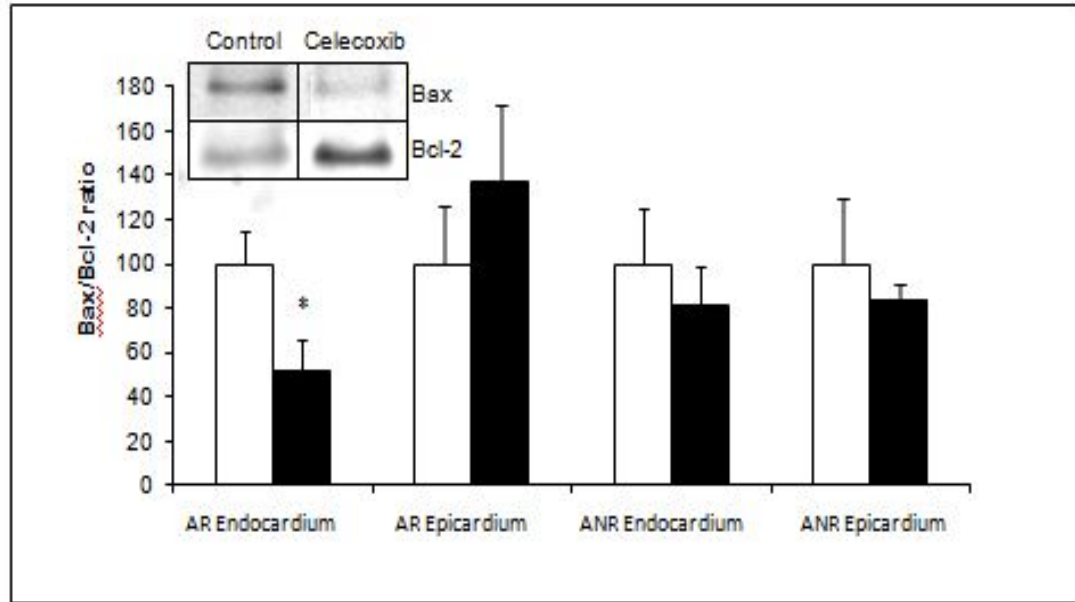
## 4.8. Figures



**Figure 1. Determination of infarct size.** After 40 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion, the results show that celecoxib treatment significantly reduces infarct size, expressed in terms of area of necrosis (I) as a percentage of the area at risk (AR) (\* $p < 0.01$  versus controls; mean $\pm$ SEM) (Fig. 1A). However, the AR, expressed as a percentage of the left ventricle (LV), was similar between groups (Fig. 1B) (□MI+Control, ■MI+Celecoxib; n=10).

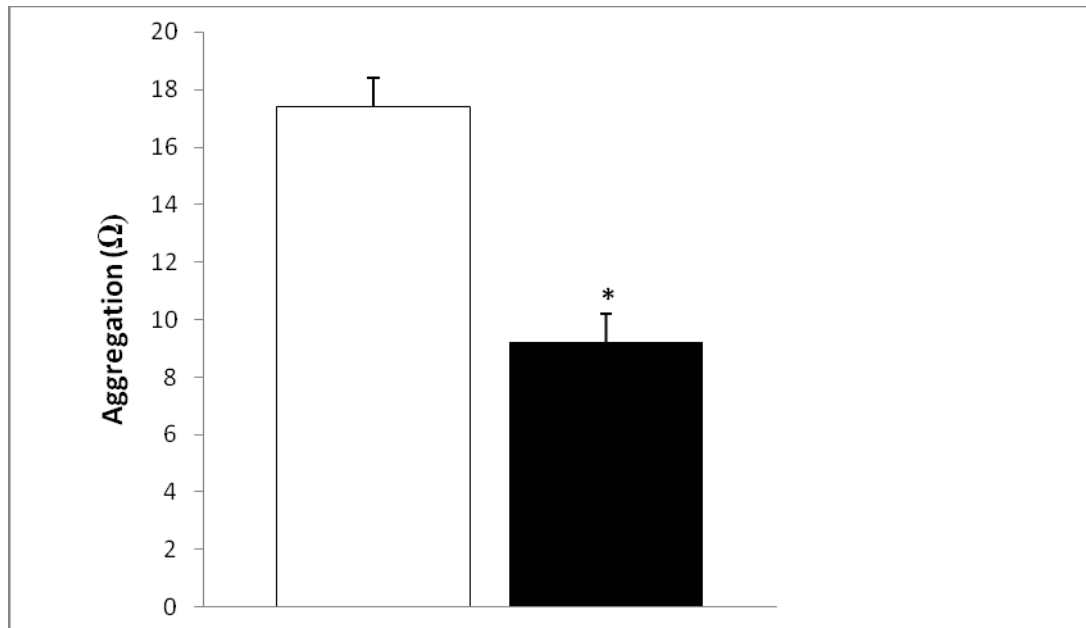


**Figure 2. Determination of neutrophil accumulation via myeloperoxidase activity.** Neutrophil accumulation, evaluated by myeloperoxidase levels, is significantly increased in the area at risk (AR) compared to the non-occluded area (ANR) (\* $p < 0.05$ ; ANR versus AR ;  $n = 9$  in each group; mean  $\pm$  SEM). However, no difference is noted between the control and celecoxib-treated groups, when comparing their respective regions.



**Figure 3. Quantification of apoptosis-related proteins during ischemia/reperfusion injury by Western blotting.** Apoptosis, expressed as the ratio of the pro-apoptotic protein Bax and the anti-apoptotic protein Bcl-2, is significantly reduced in the ischemic region of the subendocardium of the celecoxib-treated group (\* $p < 0.05$ ; □MI+Control (n=9), ■MI+Celecoxib (n=7); mean±SEM). Inset : Representative example of a western blot for Bax and Bcl-2 in the Subendocardium of the area at risk (AR).





**Figure 4. Adenosine diphosphate (ADP)-induced platelet aggregation.** ADP-induced whole blood aggregation, measured by impedance, is significantly reduced in the celecoxib-treated group (\* $p < 0.05$ ; □MI+Control (n=10), ■MI+Celecoxib (n=12); mean $\pm$ SEM).

#### 4.9. References

1. Jaksch W, Dejaco C, Schirmer M. 4 years after withdrawal of rofecoxib: where do we stand today? *Rheumatol Int* 2008
2. Chu K, Jeong SW, Jung KH, et al. Celecoxib induces functional recovery after intracerebral hemorrhage with reduction of brain edema and perihematoma cell death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:926-933
3. Winnall WR, Muir JA, Liew S, et al. Effects of chronic celecoxib on testicular function in normal and lipopolysaccharide-treated rats. *Int J Androl* 2008
4. Nery FG, Monkul ES, Hatch JP, et al. Celecoxib as an adjunct in the treatment of depressive or mixed episodes of bipolar disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Hum Psychopharmacol* 2008;23:87-94
5. Kaloustian S, Wann BP, Bah TM, et al. Celecoxib after the onset of reperfusion reduces apoptosis in the amygdala. *Apoptosis* 2007;12:1945-1951
6. Myint AM, Steinbusch HW, Goeghegan L, et al. Effect of the COX-2 inhibitor celecoxib on behavioural and immune changes in an olfactory bulbectomised rat model of depression. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:65-71
7. Schiffmann S, Maier TJ, Wobst I, et al. The anti-proliferative potency of celecoxib is not a class effect of coxibs. *Biochem Pharmacol* 2008;76:179-187

8. Chen JC, Chen Y, Su YH, Tseng SH. Celecoxib increased expression of 14-3-3sigma and induced apoptosis of glioma cells. *Anticancer Res* 2007;27:2547-2554
9. Kirkova M, Alexandova A, Kesiova M, et al. Potential antioxidant activity of celecoxib and amtolmetin guacyl: in vitro studies. *Auton Autacoid Pharmacol* 2007;27:13-18
10. Ajith T, Subin JP, Jacob J, Sanjay PS, Babitha NV. Antimutagenic and antioxidant activities of the non-steroidal anti-inflammatory drug celecoxib. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;32:888-893
11. Shinmura K, Tang XL, Wang Y, et al. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10197-10202
12. Sato H, Bolli R, Rokosh GD, et al. The cardioprotection of the late phase of ischemic preconditioning is enhanced by postconditioning via a COX-2-mediated mechanism in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2557-2564
13. de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, et al. Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Path* 1990;3:143-154
14. de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallee M, et al. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation and infarct size in dogs. *Am Heart J* 1989;117:523-532

15. Libersan D, Khalil A, Dagenais P, et al. The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc Res* 1998;37:656-666
16. Mirabet M, Garcia-Dorado D, Insete J, et al. Platelets activated by transient coronary occlusion exacerbate ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1134-1141
17. Hirata Y, Umemura K, Uematsu T, Nakashima M. An experimental myocardial infarction model in the rat and its properties. *Jpn J Pharmacol* 1995;67:51-57
18. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005;352:1092-1102
19. Zhang Z, Lai GH, Sirica AE. Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology* 2004;39:1028-1037
20. Gao F, Tao L, Yan W, et al. Early anti-apoptosis treatment reduces myocardial infarct size after a prolonged reperfusion. *Apoptosis* 2004;9:553-559
21. Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res* 2003;59:132-142
22. Drazen JM. COX-2 inhibitors--a lesson in unexpected problems. *N Engl J Med* 2005;352:1131-1132

23. Wann BP, Bah TM, Boucher M, et al. Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci* 2007;32:11-16
24. Boucher M, Pesant S, Falcao S, et al. Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43:416-422
25. Saito T, Rodger IW, Hu F, et al. Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:71-77
26. Pelliccia F, Pasceri V, Granatelli A, et al. Safety and efficacy of short-term celecoxib before elective percutaneous coronary intervention for stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2006;98:1461-1463
27. Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol* 2002;97:268-275
28. Mahmudi-Azer S, van Eeden SF. Neutrophil 'connectivity': key to neutrophil-mediated tissue injury? *Crit Care* 2003;7:285-287
29. Lukkarinen H, Laine J, Aho H, et al. Inhibition of COX-2 aggravates neutrophil migration and pneumocyte apoptosis in surfactant-depleted rat lungs. *Pediatr Res* 2006;59:412-417
30. Kimura T, Iwase M, Kondo G, et al. Suppressive effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokine release in human neutrophils. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1519-1528

31. Ruan KH, Deng H, So SP. Engineering of a protein with cyclooxygenase and prostacyclin synthase activities that converts arachidonic acid to prostacyclin. *Biochemistry* 2006;45:14003-14011
32. Brenneis C, Maier TJ, Schmidt R, et al. Inhibition of prostaglandin E2 synthesis by SC-560 is independent of cyclooxygenase 1 inhibition. *FASEB J* 2006;20:1352-1360
33. Bezugla Y, Kolada A, Kamionka S, et al. COX-1 and COX-2 contribute differentially to the LPS-induced release of PGE2 and TxA2 in liver macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006;79:93-100
34. Abbate A, Limana F, Capogrossi MC, et al. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces apoptosis in acute myocardial infarction. *Apoptosis* 2006;11:1061-1063
35. Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008;133:693-703
36. Sabbah HN, Sharov VG, Goldstein S. Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 2000;5:131-138
37. Reimer K, Lowe J, Ramussen M, Jennings R. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1-Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56:786-794
38. Gladding PA, Webster MW, Farrell HB, et al. The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers. *Am J Cardiol* 2008;101:1060-1063

39. Graff J, Skarke C, Klinkhardt U, et al. Effects of selective COX-2 inhibition on prostanoids and platelet physiology in young healthy volunteers. *J Thromb Haemost* 2007;5:2376-2385
40. Renda G, Tacconelli S, Capone ML, et al. Celecoxib, ibuprofen, and the antiplatelet effect of aspirin in patients with osteoarthritis and ischemic heart disease. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:264-274
41. Dyszkiewicz-Korpanty A, Olteanu H, Frenkel EP, Sarode R. Clopidogrel anti-platelet effect: an evaluation by optical aggregometry, impedance aggregometry, and the platelet function analyzer (PFA-100). *Platelets* 2007;18:491-496
42. Funakoshi-Tago M, Shimizu T, Tago K, et al. Celecoxib potently inhibits TNF $\alpha$ -induced nuclear translocation and activation of NF- $\kappa$ B. *Biochem Pharmacol* 2008;76:662-671

## Chapitre 5. Discussion

Cette étude orientée vers la pharmacologie cardiovasculaire nous permet maintenant de tirer des conclusions préliminaires quant aux implications d'un tel traitement en prophylaxie avec le célécoxib chez l'humain.

Comme les résultats de cette étude ont pu le démontrer, l'élément le plus marquant est la réduction significative de la taille d'infarctus (-22%) par le célécoxib, lorsqu'administré avant un infarctus du myocarde (voir Figure 1A). En effet, tel qu'abordé dans l'article ci-inclus, la réduction des dommages myocardiques seraient attribués à des mécanismes liés à l'inhibition de l'apoptose par le célécoxib. Cependant, aurait-on pu observer les mêmes effets avec une période d'administration de 7 ou 14 jours, ou l'obtention de ces résultats requiert-elle 28 jours et plus de traitement ? Puisque ce type de pré-traitement chronique avant un IM n'a pas été effectué auparavant avec un inhibiteur de COX-2, il est difficile de se prononcer sur le sujet. Une étude avec le célécoxib administré 7 jours préalablement à une angine démontre cependant que les marqueurs de dommages myocardiques sont diminués, indiquant que 7 jours seraient suffisants pour que les mécanismes de cardioprotection soient stimulés [83]. Or, lorsqu'administré 10 minutes après la reperfusion, la taille d'infarctus demeure inchangée, suggérant que les lésions de reperfusion deviennent, à ce point, irréversibles ou que la concentration efficace n'est plus à son maximum [78]. Par contre, l'étude démontrant l'effet bénéfique sur la taille d'infarctus avec le DFU, un inhibiteur de la COX-2, lorsqu'administré 30 minutes précédant l'ischémie, mais continué ensuite pour 3 mois, permet de suggérer que l'agent peut exercer un



effet aussi tôt que lorsqu'administré 30 minutes avant un IM ou qu'il est assez agressif pour exercer son action par après [82]. Mise à part ces informations, il est cliniquement prouvé que les anti-inflammatoires, tels que le célécoxib, requièrent au minimum 2 à 4 semaines d'utilisation avant que leur effet analgésique en soit ressenti [110]. Par mesure d'optimiser nos conditions expérimentales, nous avons alors considéré qu'une administration minimale de 28 jours était nécessaire. Dans cette optique, pour notre modèle animal, 3 mg/kg/jour étaient administrés continuellement pendant 28 jours, ce qui correspond à la posologie de 200 mg/jour recommandée pour les patients adultes avec ostéoarthrite [8].

Mais qu'advient-il pour les concentrations efficaces après un certain temps ? En fait, au 28<sup>e</sup> jour, alors que l'occlusion est effectuée, la demi-vie du célécoxib étant de 11h, la concentration minimale efficace est encore présente (100 mg), ce qui coïncide aussi avec la période de reperfusion, alors qu'après 77h, il ne devrait plus y rester aucune trace dans l'organisme [109]. Au 29<sup>e</sup> jour, soit 24 heures suivant la dernière dose et correspondant à la période de reperfusion, le sacrifice des rats est effectué. Puisque la concentration plasmatique efficace du célécoxib n'est plus présente, le dosage de PGE<sub>2</sub> n'est plus représentatif, ce qui explique l'absence de variation entre le groupe traité et non-traité pour cette variable. Afin de prévenir l'absence de données dans une étude future, il serait intéressant de continuer l'infusion jusqu'au sacrifice ou de planifier le dosage des marqueurs de l'inflammation à différents moments pendant le traitement et en faire une moyenne.

Il existe aussi la possibilité d'augmenter la posologie à un maximum de 200 mg BID afin de soulager l'arthrite rhumatoïde et la dysménorrhée, mais l'étude 'Cross Trial

Safety Analysis' dévoile que l'administration d'une dose une fois par jour comporte des risques cardiovasculaires inférieurs à l'administration d'une dose deux fois par jour [111]. Cette hypothèse se base sur le fait que la balance entre la thromboxane et la prostacycline se restabilise, puisque les niveaux de prostacycline sont partiellement renouvelés dans les 12 à 24 heures suivant la dernière dose unique de célécoxib. Il existe donc un avantage réel à utiliser une posologie minimale qui soit du coup efficace et sécuritaire.

Dans l'étude présentée dans ce mémoire, un résultat inattendu a été obtenu. En effet, les plaquettes tendent à s'agréger dans le myocarde ischémique et possèdent des propriétés délétères sur celui-ci. Suite à la controverse avec l'incidence augmentée d'événements prothrombiques en présence de coxibs, dû au déséquilibre entre l'homéostasie de la thromboxane et de la prostacycline, nous nous attendions à observer une augmentation de l'agrégation plaquettaire dans le groupe traité au célécoxib. Cependant, le résultat présentant une réduction de 47% de l'agrégation plaquettaire pour le groupe traité au célécoxib nous a pris par surprise (voir Figure 4). D'un côté, les plaquettes activées font partie des éléments responsables d'infliger des dommages au myocarde en situation ischémique. Cependant, ce résultat pourrait être expliqué par le fait que l'analyse de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP a été réalisée sur le sang complet plutôt que seulement sur les plaquettes activées. Néanmoins, le célécoxib est reconnu pour diminuer le décompte plaquettaire, mais non pas pour affecter l'agrégation plaquettaire [109]. Toutefois, une analyse de l'agrégation plaquettaire sur le sang complet est une méthode qui représente davantage la réalité, contrairement à l'agrégation analysée dans le plasma ou à toute

autre méthode, qui risquerait plutôt d'éliminer des éléments impliqués dans l'agrégation et fausser les résultats.

Dans le cas du célécoxib, la concentration plasmatique maximale est atteinte dans les 90 minutes suivant une dose orale unique, donc cela indique que l'administration devrait être faite minimalement 90 minutes avant un IM afin d'observer une atténuation des dommages myocardiques [112]. Cependant, comme il est impossible de prévoir la survenue d'un infarctus du myocarde, il devient intéressant de considérer la prise du célécoxib en prévention. D'un autre côté, lorsque le traitement est prolongé sur une période de vie, peut-il entraîner des complications ? Cette question demeure encore un mystère, malgré que plusieurs données dans la littérature puissent nous guider vers la réponse. En fait, plusieurs études se sont penchées sur les risques cardiovasculaires des coxibs, mais toutes ont fait l'objet de traitements à courte durée. Toutefois, l'étude comparative la plus longue consiste en l'étude CLASS, qui compare l'incidence d'ulcération gastro-intestinale du célécoxib aux AINS, moyennant 9 mois de traitement (célécoxib : posologie de 400 mg BID versus ibuprofène : posologie de 800 mg TID versus diclofénac : posologie de 75 mg BID). Cette étude a finalement révélé des risques cardiovasculaires similaires entre le célécoxib et les AINS, alors qu'une incidence d'accidents cérébrovasculaires supérieure pour les AINS a été observée [113]. Cependant, cette étude comporte certaines limites puisqu'elle ne présente pas de groupe témoin, les doses de célécoxib utilisées sont supérieures à celles normalement administrées et les résultats peuvent évidemment varier au-delà de ces 9 mois étudiés. D'autres données viennent contredire ces résultats, notamment celles du Dr Howes qui avait regroupé diverses

études sur ce coxib et conclu que 10 parmi elles présentaient un risque d'incidence d'infarctus du myocarde inchangé par le célécoxib, alors que quatre autres études avaient révélé un risque accru et même une étude avec un risque diminué en présence de célécoxib [63]. En résumé, les diverses études impliquant le célécoxib entrent parfois en contradiction, d'où le besoin de raffiner les études en améliorant les paramètres étudiés. Il y a aussi le côté éthique qui entre en jeu, pour le simple fait de ne pas risquer la santé de personnes saines dans le seul but de prévenir la survenue d'un infarctus du myocarde, évènement qui demeure incertain. Dans notre société, il est davantage acceptable de traiter une condition plutôt que de prévenir une mortalité par des moyens qui gêneraient la qualité de vie des patients. Dans cette optique, les personnes prenant le célécoxib pour traiter un historique d'arthrite seraient, d'après ces résultats, les patients les plus profiteurs du traitement, car en plus d'atténuer leurs douleurs qui restreignent leurs activités quotidiennes, ils se protégeraient contre la fatalité d'un infarctus. Toutefois, ce ne sont que des spéculations, car il reste à vérifier la reproductibilité de ces résultats sur un modèle humain.

Les études réalisées avec le DFU, montrant une réduction de la taille d'infarctus, alors qu'avec l'aspirine non, suggèrent que le mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la COX-2 et que cette enzyme posséderait des effets destructeurs sur le myocarde ischémique. Cela indique aussi l'importance de la classe des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 dans la cardioprotection. Toutefois, la barrière subtile entre la cardioprotection et la survenue d'évènements cardiovasculaires repose sur la sélectivité de ces agents sélectifs. En effet, le rofecoxib et le valdecoxib, qui ont été retirés du marché pour leur toxicité cardiaque, présentent des sélectivités

significativement plus élevées que pour le célécoxib. En fait, la sélectivité est représentée par le ratio de la sélectivité pour la COX-2 en fonction de celle pour la COX-1. Compte tenu de cette définition, le rofecoxib et le valdecoxib ont respectivement des sélectivités de 35 et de 30, alors que le célécoxib seulement de 7,5 [55]. C'est notamment aussi pour cette raison que le rofecoxib possédait une popularité supérieure auprès des patients, puisque l'analgésie était plus efficace que le célécoxib et débutait dans les 45 minutes suivant l'administration et avait une durée d'action de plus de 24 heures [114].

Globalement, avec le célécoxib, les patients atteints d'ostéoarthrite, d'arthrite rhumatoïde et de dysménorrhée peuvent notamment bénéficier du soulagement efficace de leurs douleurs, empêcher la progression de l'arthrite, diminuer la réponse biologique de la maladie et traiter les complications, tout en évitant les effets secondaires GI associés aux AINS traditionnels [110]. Les résultats présentés dans ce travail suggèrent que les patients qui subiront un IM pourraient bénéficier d'une meilleure survie grâce à une réduction des dommages associés aux lésions de reperfusion. Ironiquement, un patient voulant s'abstenir de consommer des AINS sélectifs par précaution des risques cardiovasculaires, pourrait tout aussi bien subir un infarctus fatal, non-relié à la prise de médicaments, mais plutôt à ses habitudes de vie ou ses prédispositions génétiques, et décéder, alors qu'à la lueur de ces résultats, l'infarctus aurait pu être d'une ampleur réduite avec la prise du célécoxib. Donc, le célécoxib, en plus d'offrir une qualité de vie supérieure aux patients atteints d'arthrite ou de douleurs aiguës, pourrait protéger d'un éventuel infarctus fatal, en diminuant le taux de mortalité, malgré que l'incidence de risques cardiovasculaires puisse être

similaire ou plus élevée en présence de cet agent anti-inflammatoire. Les patients doivent donc être informés des risques encourus avec un tel traitement, et leur médecin devrait les aider à peser les risques et les bénéfices dans la balance.

En effet, il existe plusieurs conditions dans lesquelles le célécoxib est déconseillé. Tout d'abord, lorsque le patient a déjà un historique d'infarctus du myocarde, d'accident cérébrovasculaire, ou de problèmes cardiaques graves, Santé Canada nous informe que le risque de récurrence est plus élevé et les éléments déclencheurs, qu'ils soient bien documentés ou pas, comme dans le cas du célécoxib, devraient être écartés des traitements. Bien que cette étude mette l'accent sur les bénéfices d'un traitement au célécoxib pour des patients à risque d'un IM, par exemple les patients ayant déjà subi un IM, il faut garder en tête l'importance première de prévenir une fatalité en se basant sur des données documentées. Or, notre étude a porté sur des rats qui étaient préalablement en parfaite santé et qui n'avaient pas d'historique de maladies cardiovasculaires. Nous devons donc documenter si les résultats obtenus s'appliquent aussi dans des conditions où des processus inflammatoires et dommages myocardiques sont initialement déclenchés. S'il advient qu'il en soit le cas aussi, nous pourrions spéculer qu'un pré-traitement au célécoxib pour les patients avec un historique de maladies CV serait bénéfique, mais pour l'instant d'autres études sont nécessaires pour arriver à de telles conclusions. Aussi, si la dose remonte à 800 mg par jour, la protection gastro-intestinale est perdue, puisque le célécoxib présente alors les mêmes risques d'ulcères gastriques que le diclofénac à 150 mg par jour (Mise en garde de Santé Canada, mai 2002) [109]. Afin de profiter des effets bénéfiques tout en étant à l'abri de risques cardiovasculaires accrus ou de la perte de

la protection GI, la dose idéale se situe à 200 mg DIE. De plus, en cas d'hypertension artérielle, de saignements ou d'ulcères GI actifs ou antécédents, il est nécessaire d'être prudent, car le célécoxib pourrait exacerber les symptômes [109]. D'un autre côté, en présence d'insuffisance hépatique sévère, le célécoxib doit être complètement évité, alors que si l'atteinte est modérée, une réduction de 50 % de la dose est requise [109]. Des précautions doivent aussi être prises lorsque le patient est allergique aux sulfamidés et aux produits apparentés afin d'éviter une allergie croisée, puisque le célécoxib possède un groupement sulfamidé [109]. Un ajustement de la dose sera aussi nécessaire pour les patients avec des polymorphismes génétiques du cytochrome 2C9, car le célécoxib est un substrat de ce cytochrome [111].

### 5.1. Limitations

Une des limitations de cette étude est représentée par le fait que les mesures biochimiques ont été effectuées dans les couches sub-endocardiques et sub-épicaudiques, indépendamment de la localisation de la zone myocardique infarctée puisque la détermination de la taille d'infarctus peut altérer les mesures biochimiques [96].

Une autre limitation présente dans cette étude consiste en un manque d'évaluation de la stabilité du célécoxib dans la pompe osmotique au bout de 28 jours. Puisque le traitement est préparé en entier au tout début et qu'il est injecté dans la pompe pour une période relativement longue, il aurait été approprié de confirmer la stabilité du

célécoxib à différents moments du protocole, afin de s'assurer que l'administration du médicament se fait dans des conditions optimales, et ainsi, s'assurer d'obtenir des résultats fiables.



## **Chapitre 6. Conclusion**

Cette étude démontre donc que le célécoxib possède des propriétés cardioprotectrices chez le rat, qui seraient possiblement transposables chez l'humain dans le but de se protéger contre la fatalité d'une éventuelle crise cardiaque lorsque pris chroniquement. Cependant, tel qu'abordé dans la discussion, il existe certaines populations pour lesquelles son utilisation demeure déconseillée. Les bénéfices du traitement doivent donc considérablement excéder ses risques et effets indésirables, de sorte que la qualité de vie des patients soit améliorée. Malgré que les résultats de cette étude présagent un avenir prometteur pour ce dernier coxib sur le marché, il demeure important de se rappeler que les études sur les animaux n'ont pas une reproductibilité absolue chez les humains, bien qu'ils puissent servir pour nous guider dans la bonne direction en nous permettant d'innover dans la recherche et le développement de médicaments.

## Chapitre 7. Bibliographie

1. World Health Organization WHO. Cardiovascular disease [En Ligne] 2009 [source citée le 13 avril 2009 ]. Disponible: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/index.html](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/index.html)
2. Fenton DE. Myocardial Infarction. [En Ligne] 2008 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible: <http://emedicine.medscape.com/article/759321-overview>
3. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. Lancet 2004;364:937-952
4. Bax L, Algra A, Mali WP, et al. Renal function as a risk indicator for cardiovascular events in 3216 patients with manifest arterial disease. Atherosclerosis 2008;200:184-190
5. Pearte CA, Furberg CD, O'Meara ES, et al. Characteristics and baseline clinical predictors of future fatal versus nonfatal coronary heart disease events in older adults: the Cardiovascular Health Study. Circulation 2006;113:2177-2185
6. Jaksch W, Dejaco C, Schirmer M. 4 years after withdrawal of rofecoxib: where do we stand today? Rheumatol Int 2008
7. Santé Canada. Médicaments et produits de santé. [En Ligne] 5 octobre 2007 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible: [http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/medeff/advisories-avis/prof/\\_2007/prexige\\_hcp-cps-fra.php](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/medeff/advisories-avis/prof/_2007/prexige_hcp-cps-fra.php)

8. Pfizer. Highlights of prescribing information. [En Ligne, fichier pdf] décembre 2008 [source citée le 13 avril 2009]. [p.1-16]. Disponible: [http://media.pfizer.com/files/products/uspi\\_celebrex.pdf](http://media.pfizer.com/files/products/uspi_celebrex.pdf)
9. Saito T, Rodger IW, Hu F, et al. Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:71-77
10. Pelliccia F, Pasceri V, Granatelli A, et al. Safety and efficacy of short-term celecoxib before elective percutaneous coronary intervention for stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2006;98:1461-1463
11. Abbate A, Salloum FN, Ockaili RA, et al. Improvement of cardiac function with parecoxib, a cyclo-oxygenase-2 inhibitor, in a rat model of ischemic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;49:416-418
12. Krijnen PA, Nijmeijer R, Meijer CJ, et al. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J Clin Pathol* 2002;55:801-811
13. Wilkins LW. Professional Guide to Diseases. 9<sup>e</sup> éd. États-Unis: Lippincott Williams and Wilkins; 2008. 1441 p.
14. National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI). Heart Attack Warning Signs. [En Ligne] Date de création inconnue [source citée le 13 avril 2009]. Disponible: <http://www.nhlbi.nih.gov/actintime/haws/haws.htm>
15. Lee D et Kulick D. Heart Attack (Myocardial Infarction). [En Ligne] 26 juin 2008 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible: [http://www.medicinenet.com/heart\\_attack/article.htm](http://www.medicinenet.com/heart_attack/article.htm)

16. Kosuge M, Kimura K, Ishikawa T, et al. Differences between men and women in terms of clinical features of ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Circ J* 2006;70:222-226
17. Apple FS. The specificity of biochemical markers of cardiac damage: a problem solved. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:1085-1089
18. McCord J, Jneid H, Hollander JE, et al. Management of cocaine-associated chest pain and myocardial infarction: a scientific statement from the American Heart Association Acute Cardiac Care Committee of the Council on Clinical Cardiology. *Circulation* 2008;117:1897-1907
19. Auteur inconnu. Comparison of invasive and conservative strategies after treatment with intravenous tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) phase II trial. The TIMI Study Group. *N Engl J Med* 1989;320:618-627
20. Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction; A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of patients with acute myocardial infarction). *J Am Coll Cardiol* 2004;44:E1-E211
21. Auteur inconnu. Reperfusion. [En Ligne] 26 mars 1998 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible:  
<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=5308>

22. Rousseau G. Cours magistral: Pharmacologie Cardiovasculaire - Ischémie/Reperfusion. Montréal: Université de Montréal; 2008
23. de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, et al. Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 1990;3:143-154
24. Merhi Y. Cours magistral: Pharmacologie cardiovasculaire - Interactions plaquettes, leucocytes et molécules d'adhésion. Montréal: Université de Montréal; 2008
25. Marleau S. Cours magistral: Pharmacodynamie - Molécules d'adhésion cellulaire. Montréal: Université de Montréal; 2008
26. Cytometry Labs, Purdue University. Phagocytic Cells & Their Function - Role of Neutrophils. [En Ligne] 6 juillet 2000 [source citée le 13 avril 2009.] [43 diapositives]. Disponible: <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/japan/lec1/index.htm>
27. Kupatt C, Wichels R, Horstkotte J, et al. Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J Leukoc Biol* 2002;72:455-461
28. Chintala MS, Bernardino V, Chiu PJ. Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation after ischemia-reperfusion in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:1203-1208
29. Massberg S, Enders G, Matos FC, et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999;94:3829-3838

30. Xu Y, Huo Y, Toufektsian MC, et al. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H692-699
31. deChamplain J. Cours magistral: Pharmacologie cardiovasculaire - Anti-oxydants. Montréal: Université de Montréal; 2008
32. De Leiris J, Boucher F, Besse, S. Reperfusion du myocarde ischémique, stress oxydatif et antioxydants: données physiopathologiques expérimentales. Grenoble: Université Joseph Fourier [En Ligne] 30 octobre 2006 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible:  
[http://www.cfperf.com/documentation/congres/toulouse/reperfusion\\_du\\_myocarde\\_isch%20miq.htm](http://www.cfperf.com/documentation/congres/toulouse/reperfusion_du_myocarde_isch%20miq.htm)
33. Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 1987;60:700-707
34. Marban E, Kitakaze M, Koretsune Y, et al. Quantification of  $[Ca^{2+}]_i$  in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1990;66:1255-1267
35. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev* 2003;83:731-801
36. Iwamoto H, Miura T, Okamura T, et al. Calpain inhibitor-1 reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemic/reperfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:580-586

37. Trumbeckaite S, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN. Calpain inhibitor (BSF 409425) diminishes ischemia/reperfusion-induced damage of rabbit heart mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2003;65:911-916
38. Yoshikawa Y, Hagihara H, Ohga Y, et al. Calpain inhibitor-1 protects the rat heart from ischemia-reperfusion injury: analysis by mechanical work and energetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1690-1698
39. Auteur inconnu. Definition of Apoptosis. [En Ligne] 1<sup>er</sup> août 2003 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible:  
<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=11287>
40. Bree RT, Stenson-Cox C, Greal M, et al. Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontology* 2002;3:195-206
41. Fulda S, Debatin KM. Apoptosis signaling in tumor therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1028:150-156
42. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004;19:124-128
43. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005;115:2665-2672
44. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;25:4798-4811
45. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316

46. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* 2004;23:2850-2860
47. deBlois D. Cours magistral: Pharmacodynamie des médicaments - Anti-inflammatoires et analgésiques périphériques. Montréal: Université de Montréal; 2007
48. William C Shiel Jr. Arthritis Medications. [En Ligne] 9 février 2006 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible: <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=15144&page=2>
49. William C Shiel Jr. Arthritis Medications. [En Ligne] 9 février 2006 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible: <http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=15144&page=3>
50. Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique. Glucocorticoïdes. [En Ligne] 25 novembre 2008 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible: [http://www.cbip.be/GGR/MPG/MPG\\_GA.cfm](http://www.cbip.be/GGR/MPG/MPG_GA.cfm)
51. Trendel D. Pros and Cons of Glucocorticoids - Do the Benefits Outweigh the Risks? [En Ligne] 18 septembre 2008 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible: <http://copd.about.com/od/emphysema/a/glucocorticoids.htm>
52. Wilcke JR. Veterinary Clinical Pharmacology - Glucocorticoids. [En Ligne] Printemps 2008 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible: <http://cpharm.vetmed.vt.edu/vm8784/default.htm>
53. Resplandy F. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). [En Ligne] 28 janvier 2009 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible:



[http://www.doctissimo.fr/html/medicaments/articles/sa\\_4093\\_ains.htm](http://www.doctissimo.fr/html/medicaments/articles/sa_4093_ains.htm)

54. Allain H. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). [En Ligne] 23 janvier 1999 [source citée le 13 avril 2009]. Disponible:  
<http://www.med.univ-rennes1.fr/etud/pharmaco/AINS.htm>
55. Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol* 2006;57 Suppl 5:113-124
56. White WB. Cardiovascular effects of the cyclooxygenase inhibitors. *Hypertension* 2007;49:408-418
57. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996;384:644-648
58. Blain H, Jouzeau JY, Netter P, Jeandel C. Non-steroidal anti-inflammatory agents with selective inhibitory activity on cyclooxygenase-2. Interest and future prospects. *Rev Med Interne* 2000;21:978-988
59. Bombardier C, Laine L, Reicin A, et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:1520-1528
60. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005;352:1092-1102
61. National Cancer Institute. Celecoxib, Rofecoxib Associated With Risk of Cardiovascular Events. [En Ligne] 15 février 2005. *New England Journal of Medicine*, early online publication [source citée le 13 avril 2009]. Disponible:

<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/results/cox-inhibitor-trials0205/print?page=&keyword=>

62. Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, et al. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med* 2005;352:1081-1091
63. Howes LG. Selective COX-2 inhibitors, NSAIDs and cardiovascular events - is celecoxib the safest choice? *Ther Clin Risk Manag* 2007;3:831-845
64. Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, et al. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2006;355:873-884
65. Sowers JR, White WB, Pitt B, et al. The Effects of cyclooxygenase-2 inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory therapy on 24-hour blood pressure in patients with hypertension, osteoarthritis, and type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2005;165:161-168
66. Aw TJ, Haas SJ, Liew D, Krum H. Meta-analysis of cyclooxygenase-2 inhibitors and their effects on blood pressure. *Arch Intern Med* 2005;165:490-496
67. Walter MF, Jacob RF, Day CA, et al. Sulfone COX-2 inhibitors increase susceptibility of human LDL and plasma to oxidative modification: comparison to sulfonamide COX-2 inhibitors and NSAIDs. *Atherosclerosis* 2004;177:235-243
68. Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, et al. Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res* 2002;90:602-608

69. Murray J, Barbara JA, Dunkley SA, et al. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* 1997;90:2772-2783
70. Rink L, Kirchner H. Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;111:199-209
71. Kimura T, Iwase M, Kondo G, et al. Suppressive effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokine release in human neutrophils. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1519-1528
72. Abbate A, Limana F, Capogrossi MC, et al. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces apoptosis in acute myocardial infarction. *Apoptosis* 2006;11:1061-1063
73. Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008;133:693-703
74. Sabbah HN, Sharov VG, Goldstein S. Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 2000;5:131-138
75. Chu K, Jeong SW, Jung KH, et al. Celecoxib induces functional recovery after intracerebral hemorrhage with reduction of brain edema and perihematomal cell death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:926-933
76. Winnall WR, Muir JA, Liew S, et al. Effects of chronic celecoxib on testicular function in normal and lipopolysaccharide-treated rats. *Int J Androl* 2008

77. Nery FG, Monkul ES, Hatch JP, et al. Celecoxib as an adjunct in the treatment of depressive or mixed episodes of bipolar disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Hum Psychopharmacol* 2008;23:87-94
78. Kaloustian S, Wann BP, Bah TM, et al. Celecoxib after the onset of reperfusion reduces apoptosis in the amygdala. *Apoptosis* 2007;12:1945-1951
79. Myint AM, Steinbusch HW, Goeghegan L, et al. Effect of the COX-2 inhibitor celecoxib on behavioural and immune changes in an olfactory bulbectomised rat model of depression. *Neuroimmunomodulation* 2007;14:65-71
80. Schiffmann S, Maier TJ, Wobst I, et al. The anti-proliferative potency of celecoxib is not a class effect of coxibs. *Biochem Pharmacol* 2008;76:179-187
81. Chen JC, Chen Y, Su YH, Tseng SH. Celecoxib increased expression of 14-3-3sigma and induced apoptosis of glioma cells. *Anticancer Res* 2007;27:2547-2554
82. Kirkova M, Alexandova A, Kesiova M, et al. Potential antioxidant activity of celecoxib and amtolmetin guacyl: in vitro studies. *Auton Autacoid Pharmacol* 2007;27:13-18
83. Ajith T, Subin JP, Jacob J, Sanjay PS, Babitha NV. Antimutagenic and antioxidant activities of the non-steroidal anti-inflammatory drug celecoxib. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005;32:888-893

84. Shinmura K, Tang XL, Wang Y, et al. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10197-10202
85. Sato H, Bolli R, Rokosh GD, et al. The cardioprotection of the late phase of ischemic preconditioning is enhanced by postconditioning via a COX-2-mediated mechanism in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H2557-2564
86. de Lorgeril M, Rousseau G, Basmadjian A, et al. Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Path* 1990;3:143-154
87. de Lorgeril M, Basmadjian A, Lavallee M, et al. Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation and infarct size in dogs. *Am Heart J* 1989;117:523-532
88. Libersan D, Khalil A, Dagenais P, et al. The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc Res* 1998;37:656-666
89. Mirabet M, Garcia-Dorado D, Insete J, et al. Platelets activated by transient coronary occlusion exacerbate ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1134-1141
90. Hirata Y, Umemura K, Uematsu T, Nakashima M. An experimental myocardial infarction model in the rat and its properties. *Jpn J Pharmacol* 1995;67:51-57

91. Zhang Z, Lai GH, Sirica AE. Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology* 2004;39:1028-1037
92. Gao F, Tao L, Yan W, et al. Early anti-apoptosis treatment reduces myocardial infarct size after a prolonged reperfusion. *Apoptosis* 2004;9:553-559
93. Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res* 2003;59:132-142
94. Drazen JM. COX-2 inhibitors--a lesson in unexpected problems. *N Engl J Med* 2005;352:1131-1132
95. Wann BP, Bah TM, Boucher M, et al. Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci* 2007;32:11-16
96. Boucher M, Pesant S, Falcao S, et al. Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43:416-422
97. Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol* 2002;97:268-275
98. Mahmudi-Azer S, van Eeden SF. Neutrophil 'connectivity': key to neutrophil-mediated tissue injury? *Crit Care* 2003;7:285-287

99. Lukkarinen H, Laine J, Aho H, et al. Inhibition of COX-2 aggravates neutrophil migration and pneumocyte apoptosis in surfactant-depleted rat lungs. *Pediatr Res* 2006;59:412-417
100. Ruan KH, Deng H, So SP. Engineering of a protein with cyclooxygenase and prostacyclin synthase activities that converts arachidonic acid to prostacyclin. *Biochemistry* 2006;45:14003-14011
101. Brenneis C, Maier TJ, Schmidt R, et al. Inhibition of prostaglandin E2 synthesis by SC-560 is independent of cyclooxygenase 1 inhibition. *FASEB J* 2006;20:1352-1360
102. Bezugla Y, Kolada A, Kamionka S, et al. COX-1 and COX-2 contribute differentially to the LPS-induced release of PGE2 and TxA2 in liver macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006;79:93-100
103. Reimer K, Lowe J, Ramussen M, Jennings R. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1-Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56:786-794
104. Gladding PA, Webster MW, Farrell HB, et al. The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers. *Am J Cardiol* 2008;101:1060-1063
105. Graff J, Skarke C, Klinkhardt U, et al. Effects of selective COX-2 inhibition on prostanoids and platelet physiology in young healthy volunteers. *J Thromb Haemost* 2007;5:2376-2385

106. Renda G, Tacconelli S, Capone ML, et al. Celecoxib, ibuprofen, and the antiplatelet effect of aspirin in patients with osteoarthritis and ischemic heart disease. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:264-274
107. Dyszkiewicz-Korpanty A, Olteanu H, Frenkel EP, Sarode R. Clopidogrel anti-platelet effect: an evaluation by optical aggregometry, impedance aggregometry, and the platelet function analyzer (PFA-100). *Platelets* 2007;18:491-496
108. Funakoshi-Tago M, Shimizu T, Tago K, et al. Celecoxib potently inhibits TNF $\alpha$ -induced nuclear translocation and activation of NF- $\kappa$ B. *Biochem Pharmacol* 2008;76:662-671
109. Anonyme. Rx Vigilance (Cédérom) - Monographie du Célébrex. Repentigny: Vigilance Santé Inc.; 2008.
110. Anonyme. Rx Vigilance (Cédérom) - L'arthrite rhumatoïde. Repentigny: Vigilance Santé Inc.; 2008.
111. Solomon SD, Wittes J, Finn PV, et al. Cardiovascular risk of celecoxib in 6 randomized placebo-controlled trials: the cross trial safety analysis. *Circulation* 2008;117:2104-2113
112. Association des pharmaciens du Canada. Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques. 9<sup>e</sup> éd. Ottawa: Association des pharmaciens du Canada; 2008.
113. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and



rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial.

Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. JAMA 2000;284:1247-1255

114. Anonyme. Rx Vigilance (Cédérom) - Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Repentigny: Vigilance Santé Inc; 2008.