

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Rôle de la cyclo-oxygénase-2 constitutive dans la  
synthèse des prostaglandines et caractérisation de ses  
relations avec les prostaglandines synthases terminales**

par

Pierre-Olivier Héту

Département de biochimie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en biochimie

mai, 2008

©, Pierre-Olivier Héту, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Rôle de la cyclo-oxygénase-2 constitutive dans la synthèse des  
prostaglandines et caractérisation de ses relations avec les  
prostaglandines synthases terminales**

présentée par:

Pierre-Olivier Héту

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Guy Boileau  
président-rapporteur

Denis Riendeau  
directeur de recherche

Daniel Lajeunesse  
membre du jury

Pierre Borgeat  
examineur externe

Pascal Chartrand  
représentant du doyen de la FES

Thèse acceptée le: \_\_\_\_\_

## SOMMAIRE

Les prostanoïdes, incluant les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TX), sont synthétisées par l'action concertée des cyclo-oxygénases (COX) et des prostanoïdes synthèses terminales. Deux COX majeures ont été identifiées: COX-1, qui est principalement exprimée de façon constitutive, et COX-2, qui est inductible et responsable de la synthèse accrue des prostanoïdes observée dans diverses conditions patho-physiologiques. Par contre, la COX-2 est aussi constitutivement exprimée dans certains tissus, tels les reins, les poumons et le cerveau, où sa contribution à la synthèse des différentes prostanoïdes n'a été que peu caractérisée. Par ailleurs, il a été proposé que certaines prostanoïdes synthèses, notamment la PGE<sub>2</sub> synthase microsomale de type-1 (mPGES-1) et la prostacycline synthase (PGIS), puissent être préférentiellement associées à COX-2 par rapport à COX-1.

Nous avons donc caractérisé le rôle de la COX-2 constitutive dans la synthèse des prostanoïdes ainsi que ses relations avec les prostanoïdes synthèses, en particulier avec la mPGES-1 et la PGIS. En premier lieu, nous avons utilisé une nouvelle méthode de photo-pontage pour détecter les interactions protéine-protéine de la COX-2 et de la mPGES-1. Nos données montrent que COX-2 existe sous forme de dimère et que la mPGES-1 forme un oligomère dans les cellules intactes, sans aucune évidence d'une interaction directe entre ces deux enzymes.

Ensuite, nous avons quantifié la distribution de la PGIS dans l'endothélium vasculaire de chien ainsi que sa co-localisation avec COX-1 et COX-2. Nos résultats montrent que la PGIS est largement exprimée le long de l'endothélium alors que la COX-2 n'est que faiblement exprimée à certains endroits sans co-localisation

préférentielle avec la PGIS. De plus, nos études d'inhibition *in vivo* chez le rat indiquent que les niveaux de prostacycline dans l'aorte sont réduits par un inhibiteur sélectif de COX-1, mais non par un inhibiteur sélectif de COX-2. Ces données suggèrent que la COX-2 est quantitativement peu importante pour la synthèse de prostacycline dans l'aorte. À l'opposé, l'inhibition sélective de COX-2 chez le rat entraîne une diminution des niveaux de toutes les prostanoides majeures dans les reins et le cerveau, démontrant l'activité de la COX-2 constitutive dans ces tissus et sa capacité à fournir le substrat pour chacune des voies de synthèse terminales (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> et TXA<sub>2</sub>).

Finalement, nous avons caractérisé la distribution tissulaire et évalué la contribution de la mPGES-1 à la synthèse constitutive de PGE<sub>2</sub> chez la souris. Nos résultats montrent que la mPGES-1 est abondamment exprimée dans le tissu adipeux blanc. De plus, les niveaux de mPGES-1 et de PGE<sub>2</sub> sont diminués chez les animaux obèses, ce qui pourrait contribuer aux changements de la lipolyse et de l'adipogénèse associés à cette condition.

En conclusion, nos résultats montrent que la COX-2 et la mPGES-1 participent toutes deux à la synthèse constitutive des prostanoides dans certains tissus. De plus, nous n'avons trouvé aucune évidence d'une association préférentielle de la mPGES-1 ou de la PGIS avec COX-2, ce qui suggère que les données de couplage basées sur les études *in vitro* ne sont pas simplement extrapolables aux conditions *in vivo*.

---

**Mots clés:** Prostanoides; Prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>); Prostacycline (PGI<sub>2</sub>); Inhibiteur sélectif de COX-2 (coxib); PGE<sub>2</sub> synthase microsomale (mPGES-1); Prostacycline synthase (PGIS); Inflammation; Cerveau; Rein; Endothélium vasculaire.

## SUMMARY

Prostanoids, including prostaglandins (PGs) and thromboxanes (TXs), are synthesized by the concerted action of cyclooxygenases (COXs) and terminal prostanoid synthases. Two major COXs were identified: COX-1, which is principally expressed constitutively, and COX-2, which is inducible and responsible for the increased prostanoid synthesis observed in several patho-physiological conditions. However, COX-2 is also constitutively expressed in certain tissues, such as kidneys, lungs, and brain, where its contribution to the synthesis of the different prostanoids has only been partially characterized. Moreover, certain prostanoid synthases, such as microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-1 (mPGES-1) and prostacyclin synthase (PGIS), have been proposed to be preferentially associated with COX-2 compared to COX-1.

We have thus characterized the role of the constitutive COX-2 in the synthesis of prostanoids and its relation with prostanoid synthases, in particular with mPGES-1 and PGIS. First, we used a new photo-crosslinking method to detect the protein-protein interactions of COX-2 and mPGES-1. Our data show that COX-2 exists as a dimer and that mPGES-1 forms an oligomer in intact cells, without any evidence of a direct interaction between the two enzymes.

We then quantified the distribution of PGIS in the vascular endothelium of dog and its co-localization with COX-1 and COX-2. Our results show that PGIS is largely expressed along the endothelium, while COX-2 is only slightly expressed in some localized foci and is not preferentially co-localized with PGIS. In addition, our *in vivo* inhibition studies in rats indicate that the levels of prostacyclin in aorta are reduced by a selective COX-1 inhibitor, but not by a selective COX-2 inhibitor. These data suggest

that COX-2 is not quantitatively important for the synthesis of prostacyclin in the aorta. On the other hand, the selective inhibition of COX-2 in rats reduces the levels of all major prostanoids in kidneys and brain, demonstrating the constitutive activity of COX-2 in these tissues and its capacity to provide the substrate for the different prostanoid synthetic pathways (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, and TXA<sub>2</sub>).

Finally, we have characterized the tissue distribution and evaluated the contribution of mPGES-1 to the constitutive synthesis of PGE<sub>2</sub> in mice. Our results show that mPGES-1 is abundantly expressed in white adipose tissue. Moreover, the levels of mPGES-1 and of PGE<sub>2</sub> are decreased in obese animals, which may contribute to the changes in lipolysis and adipogenesis associated with this condition.

In conclusion, our results show that COX-2 and mPGES-1 both participate in the constitutive synthesis of prostanoids in certain tissues. In addition, we have not found any evidence of a preferential association between COX-2 and mPGES-1 or PGIS, which suggest that the *in vitro* data on the coupling between these enzymes can not be simply extrapolated to *in vivo* conditions.

---

**Key words:** Prostanoids; Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>); Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>); Selective COX-2 inhibitor (coxib); microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-1 (mPGES-1); Prostacyclin synthase (PGIS); Inflammation; Brain; Kidney; Vascular endothelium.

## TABLE DES MATIÈRES

Page d'identification du jury _____	p. ii
Sommaire _____	p. iii
Sommaire en anglais _____	p. v
Table des matières _____	p. vii
Liste des tableaux _____	p. xii
Liste des figures _____	p. xiii
Liste des abréviations _____	p. xvi
Dédicace _____	p. xviii
Remerciements _____	p. xix
<b><u>PREMIÈRE PARTIE: INTRODUCTION</u></b> _____	<b>p. 1</b>
<b>1. PROSTANOÏDES, LEUCOTRIÈNES ET AUTRES EICOSANOÏDES</b> _____	<b>p. 2</b>
<b>1.1. La synthèse des eicosanoïdes</b> _____	<b>p. 2</b>
<b>1.2. Les principales prostanoïdes et leurs récepteurs</b> _____	<b>p. 2</b>
1.2.1. La PGE <sub>2</sub> _____	p. 5
1.2.1.1. Le récepteur EP <sub>1</sub> _____	p. 7
1.2.1.2. Le récepteur EP <sub>2</sub> _____	p. 8
1.2.1.3. Les récepteurs EP <sub>3</sub> _____	p. 9
1.2.1.4. Le récepteur EP <sub>4</sub> _____	p. 11
1.2.2. La PGD <sub>2</sub> _____	p. 12



1.2.3. La PGI <sub>2</sub>	p. 13
1.2.4. La PGF <sub>2α</sub>	p. 16
1.2.5. Les thromboxanes	p. 17
<b>1.3. Les leucotriènes</b>	<b>p. 18</b>
<b>1.4. Les lipoxines</b>	<b>p. 21</b>
<b>1.5. Les époxydes</b>	<b>p. 22</b>
<b>1.6. Les isoprostanes</b>	<b>p. 23</b>
<b>2. LES ENZYMES RESPONSABLES DE LA SYNTHÈSE DES PROSTANOÏDES</b>	<b>p. 24</b>
<b>2.1. Les phospholipases</b>	<b>p. 24</b>
<b>2.2. Les cyclo-oxygénases</b>	<b>p. 25</b>
2.2.1. COX-1	p. 26
2.2.1.1. Structure tridimensionnelle et mécanisme réactionnel de la COX-1	p. 26
2.2.2. COX-2	p. 27
2.2.2.1. Structure tridimensionnelle de COX-2	p. 30
2.2.2.2. Voies de signalisation impliquées dans l'induction de la COX-2	p. 31
2.2.2.3. Implication de la COX-2 dans divers pathologies	p. 31
2.2.2.4. Expression constitutive de la COX-2	p. 32
2.2.3. Autres variants des cyclo-oxygénases	p. 33
2.2.4. Phénotypes des souris déficientes en cyclo-oxygénases	p. 34

<b>2.3. Les prostanoides synthases terminales</b>	p. 36
2.3.1. Les PGE <sub>2</sub> synthases	p. 36
2.3.1.1. mPGES-1	p. 37
2.3.1.1.1. Structure de la mPGES-1	p. 39
2.3.1.1.2. Expression constitutive et inductible de la mPGES-1	p. 39
2.3.1.1.3. Implication de la mPGES-1 dans différentes pathologies	p. 40
2.3.1.1.4. Phénotype des souris déficientes en mPGES-1	p. 42
2.3.1.2. mPGES-2	p. 44
2.3.1.3. cPGES	p. 45
2.3.1.4. Autres protéines pouvant former de la PGE <sub>2</sub>	p. 46
2.3.2. La prostacycline synthase	p. 46
2.3.3. Les PGD <sub>2</sub> synthases	p. 47
2.3.3.1. L-PGDS	p. 48
2.3.3.2. H-PGDS	p. 49
2.3.4. Les PGF synthases	p. 49
2.3.4.1. PGFS	p. 50
2.3.4.2. PGH <sub>2</sub> 9,11-endoperoxyde réductase	p. 53
2.3.4.3. PGE <sub>2</sub> 9-cétoréductase	p. 53
2.3.5. La thromboxane synthase	p. 54

<b>3. INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DES PROSTAGLANDINES</b>	p. 56
<b>3.1. Les AINS</b>	p. 56
3.1.1. Acétylation des COX par l'acide acétylsalicylique	p. 57
3.1.2. Inhibition compétitive ou dépendante du temps	p. 58
3.1.3. Efficacité thérapeutique des AINS traditionnels	p. 58
3.1.4. Effets secondaires des AINS traditionnels	p. 60
<b>3.2. Les coxibs</b>	p. 61
3.2.1. Efficacité thérapeutique des coxibs	p. 61
3.2.2. Effets secondaires des coxibs	p. 62
<b>3.3. Les inhibiteurs de la mPGES-1</b>	p. 65
<b>4. LES RELATIONS ENTRE LES ENZYMES DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DES PROSTANOÏDES</b>	p. 66
<b>4.1. COX / PGES</b>	p. 66
<b>4.2. COX-2 / PGIS</b>	p. 68
<b>4.3. COX et autres synthèses terminales</b>	p. 69

**DEUXIÈME PARTIE: RÉSULTATS** **p. 71**

- 5. Hypothèses, objectifs et résumé des résultats** \_\_\_\_\_ p. 72
- 6. Premier article:** "Photo-crosslinking of proteins in intact cells reveals a dimeric structure of cyclooxygenase-2 and an inhibitor-sensitive oligomeric structure of microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1" \_\_\_\_\_ p. 76
- 7. Deuxième article:** "Double-label expression studies of prostacyclin synthase, thromboxane synthase and COX isoforms in normal aortic endothelium" \_\_\_\_\_ p. 109
- 8. Troisième article:** "Cyclo-oxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain" \_\_\_\_\_ p. 154
- 9. Quatrième article:** "Down-regulation of microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-1 in adipose tissue by high fat feeding" \_\_\_\_\_ p. 188

**TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION ET CONCLUSIONS** **p. 222**

- 10. Discussion** \_\_\_\_\_ p. 223
- 10.1. Structures de la mPGES-1 et de la COX-2 \_\_\_\_\_ p. 223
- 10.2. Couplage entre la COX-2 et la mPGES-1 \_\_\_\_\_ p. 226
- 10.3. Couplage entre la COX-2 et la PGIS \_\_\_\_\_ p. 227
- 10.4. Synthèse constitutive de prostaglandines par la COX-2 et la mPGES-1 \_\_\_\_\_ p. 231
- 11. Conclusion** \_\_\_\_\_ p. 234
- 12. Perspectives** \_\_\_\_\_ p. 236
- 13. Références** \_\_\_\_\_ p. 237

**LISTE DES TABLEAUX****CHAPITRE 1.**

**Tableau I.** Les récepteurs de prostanoïdes et leurs principales fonctions \_\_\_\_\_ p. 4

**CHAPITRE 2.**

**Tableau II.** Propriétés physiques et catalytiques des PGES majeures \_\_\_\_\_ p. 37

**CHAPITRE 8.**

**Tableau I.** "Relative abundance of each prostanoid measured in different rat tissues" \_\_\_\_\_ p. 180

**Tableau II.** "Tissue concentrations of MF tricyclic" \_\_\_\_\_ p. 181

**Tableau III.** "Inhibition of total prostanoid content in selected rat tissues by co-administration of selective COX inhibitors (SC-560 + MF tricyclic) and indomethacin" \_\_\_\_\_ p. 182

**Tableau IV.** "Increased prostanoid content in dissected kidney cortex and medulla as compared with whole kidney extracts" \_\_\_\_\_ p. 183

**CHAPITRE 9.**

**Tableau I.** "PGE<sub>2</sub> levels in inguinal WAT of lean and obese animals" \_\_\_\_\_ p. 216

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1.

- Figure 1.** Synthèse des principaux types d'eicosanoïdes \_\_\_\_\_ p. 3
- Figure 2.** Voie de synthèse des prostanoïdes \_\_\_\_\_ p. 6
- Figure 3.** Métabolisme non enzymatique de la PGD<sub>2</sub>, de la PGI<sub>2</sub> et du  
TXA<sub>2</sub> \_\_\_\_\_ p. 14
- Figure 4.** Voie de synthèse des leucotriènes \_\_\_\_\_ p. 19

### CHAPITRE 2.

- Figure 5.** Mécanisme de cyclo-oxygénation de l'acide arachidonique \_\_\_\_\_ p. 28
- Figure 6.** Alignement de séquence des protéines humaines membres de la  
famille des MAPEG \_\_\_\_\_ p. 38
- Figure 7.** Voies de synthèse de la prostaglandine F<sub>2</sub> \_\_\_\_\_ p. 51

### CHAPITRE 6

- Figure 1.** "Structure of photo-methionine and sites of methionine  
incorporation in mPGES-1" \_\_\_\_\_ p. 103
- Figure 2.** "Crosslinking of COX-2 to the dimeric form" \_\_\_\_\_ p. 104
- Figure 3.** "Chemical and photo-chemical crosslinking of mPGES-1" \_\_\_\_\_ p. 105
- Figure 4.** "Photo-crosslinking patterns of mPGES-1 or COX-2 in A549  
cells under various conditions that affect PGE<sub>2</sub> production" \_\_\_\_\_ p. 106

- Figure 5.** "Modification of the photo-crosslinking pattern of mPGES-1  
by a PGH<sub>2</sub> substrate analogue" \_\_\_\_\_ p. 107
- Figure 6.** "Modification of the photo-crosslinking pattern of mPGES-1  
by a selective inhibitor" \_\_\_\_\_ p. 108

## **CHAPITRE 7**

- Figure 1.** "Double-label immunofluorescence microscopy of COX-1,  
COX-2 and PGIS in dog aorta" \_\_\_\_\_ p. 149
- Figure 2.** "Immunoblotting of COX-2 in LPS-stimulated dog peripheral  
blood mononuclear cells" \_\_\_\_\_ p. 149
- Figure 3.** "Dual labeling of the carotid artery endothelium at the aortic  
branch-point" \_\_\_\_\_ p. 150
- Figure 4.** "TXS is widely co-expressed with COX-1 and co-localizes  
with small foci of COX-2 in dog aortic endothelium" \_\_\_\_\_ p. 150
- Figure 5.** "Quantification of COX-1, COX-2, and PGIS in normal canine  
aortic endothelium" \_\_\_\_\_ p. 151
- Figure 6.** "Expression of COX-2 and PGIS in the dog lung" \_\_\_\_\_ p. 151
- Figure 7.** "Dual-immunostaining of COX-1, COX-2 and PGIS in human  
aorta and IBD colon" \_\_\_\_\_ p. 152
- Figure 8.** "Effect of selective inhibitors of COX-1 and COX-2 on the  
levels of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and TXB<sub>2</sub> in rat aortic tissue" \_\_\_\_\_ p. 152
- Figure 9.** "Double-labeling of COX-1, COX-2 and PGIS in the rat aorta  
and kidney" \_\_\_\_\_ p. 153

**CHAPITRE 8**

- Figure 1.** "Effect of treatment with the selective COX-1 inhibitor SC-560 or the selective COX-2 inhibitor MF tricyclic on total prostanoid content of various rat tissues" \_\_\_\_\_ p. 186
- Figure 2.** "Effect of selective COX-2 inhibition on total prostanoid content of rat kidney and forebrain" \_\_\_\_\_ p. 186
- Figure 3.** "Profile of prostanoid content in rat kidney after selective COX-1 and COX-2 inhibition" \_\_\_\_\_ p. 187
- Figure 4.** "Effect of selective COX-2 inhibition on individual prostanoid levels in rat forebrain" \_\_\_\_\_ p. 187

**CHAPITRE 9**

- Figure 1.** "Expression of mPGES-1 in preadipocytes, adipocytes, and whole WAT" \_\_\_\_\_ p. 219
- Figure 2.** "The expression of mPGES-1 protein in WAT is dependent on fat depot" \_\_\_\_\_ p. 220
- Figure 3.** "Decrease in the expression of mPGES-1 in epididymal and inguinal WAT during diet-induced obesity in mice" \_\_\_\_\_ p. 221



**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

12-HHTrE:	acide 12-hydroxyheptadécatriénoïque
15d-PGJ <sub>2</sub> :	15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ <sub>2</sub>
5-LO:	5-lipoxygénase
AAS:	acide acétylsalicylique (aspirine)
ADNc:	ADN complémentaire
AINS:	anti-inflammatoire non stéroïdien
AKR:	aldo-céto-réductase
AMPC:	adénosine monophosphate cyclique
ARNm:	ARN messenger
COX:	cyclo-oxygénase
Coxib:	inhibiteur sélectif de la COX-2
cPGES:	PGES cytosolique
CYP:	cytochrome P450
cys-LT:	cystéinyl-leucotriène
DP:	récepteur de PGD <sub>2</sub>
EpETrE:	acide époxyeicosatriénoïque
EP:	récepteur de prostaglandine E <sub>2</sub>
FLAP:	5-lipoxygenase activating protein
FP:	récepteur de prostaglandine F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
GSH:	glutathion
GST:	glutathion S-transférase

HETE:	acide hydroxyeicosatetraénoïque
H-PGDS:	PGDS hématopoïétique
IgE:	immunoglobuline E
IP:	récepteur de prostacycline
LO:	lipoxygénase
L-PGDS:	PGDS de type lipocaline
LPS:	lipopolysaccharide
LT:	leucotriène
LX:	lipoxine
MAPEG:	membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism
mGST1:	glutathion S-transférase membranaire de type 1
mPGES-1:	PGES microsomale de type 1
mPGES-2:	PGES microsomale de type 2
PG:	prostaglandine
PGDS:	prostaglandine D <sub>2</sub> synthase
PGES:	prostaglandine E <sub>2</sub> synthase
PGFS:	prostaglandine F synthase
PGIS:	prostacycline synthase
Photo-Met:	photo-méthionine (analogue photo-activable de la méthionine)
PLA <sub>2</sub> :	phospholipase A <sub>2</sub>
RCPG:	récepteur couplé aux protéines G
TX:	thromboxane
TXS:	thromboxane synthase

*Aux deux femmes de ma vie, Véronique et Naomie*

*...et à la mémoire de mon père*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon épouse, Véronique, sans qui mon désir d'entreprendre des études supérieures n'aurait pu se concrétiser. Ta patience, ton support et tes encouragements ont su me guider à travers les moments plus difficiles. Merci aussi à toi, Nicolas. C'est un peu grâce à toi si j'ai eu la pique de la biochimie durant mes études de baccalauréat. Nous avons emprunté, jusqu'ici, des chemins communs et durant ce temps j'ai découvert en toi non seulement un scientifique passionné, mais aussi un grand ami.

Un merci tout particulier à mon superviseur qui m'a pratiquement tout appris durant ces cinq dernières années. Denis, tu as été un mentor exceptionnel et tu es toujours un modèle pour moi. J'ai beaucoup apprécié la confiance que tu m'as accordée. Ton soutien, que ce soit professionnellement ou personnellement, a toujours été impeccable. Tu as su, je le crois, me transmettre au cours de ces dernières années ton sens analytique et ta rigueur, des qualités essentielles pour tout bon scientifique. Merci beaucoup.

Merci aussi à Marc Ouellet, Sylvie Desmarais, David Claveau, Jean-Pierre Falguyret et à tous les autres collègues de chez Merck Frosst qui ont contribué à ma formation en me donnant toujours l'aide dont j'avais besoin et qui ont plusieurs fois stimulé ma réflexion sur les problèmes auxquels je faisais face.

Finalement, je ne peux pas passer sous silence la contribution financière des organismes subventionnaires, le CRSNG et le FRSQ, qui ont cru en moi. Merci.

**PREMIÈRE PARTIE:**

**INTRODUCTION**

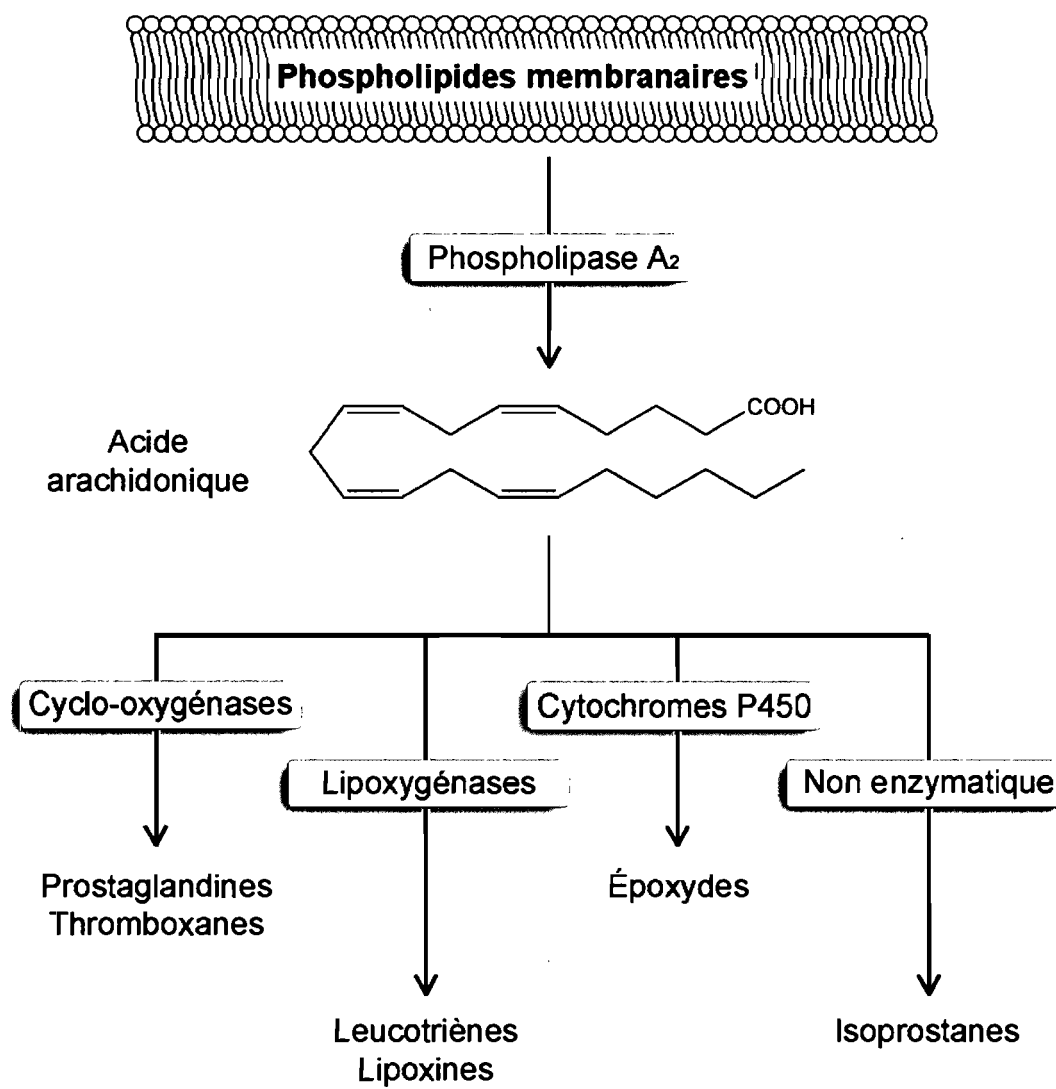
## **CHAPITRE 1. PROSTANOÏDES, LEUCOTRIÈNES ET AUTRES EICOSANOÏDES**

### **1.1. La synthèse des eicosanoïdes.**

Les eicosanoïdes sont des médiateurs lipidiques dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique, un acide gras polyinsaturé possédant 20 carbones (C20:4) (Fig. 1), et comprennent, entre autres, les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes [1]. L'acide arachidonique est synthétisé à partir de l'acide linoléique, un acide gras essentiel, ou est directement assimilé des aliments ingérés [2]. L'acide arachidonique est ensuite incorporé dans les membranes biologiques par une estérification préférentielle en position sn-2 des phospholipides [3]. Par conséquent, la première étape dans la synthèse des eicosanoïdes est l'hydrolyse de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires par l'action de phospholipases. L'acide arachidonique libéré sert de précurseur pour la synthèse des divers eicosanoïdes [1]. Les principaux types d'eicosanoïdes sont les prostanoïdes (incluant les prostaglandines et les thromboxanes), les leucotriènes, les lipoxines, les époxydes et les isoprostanes (Fig. 1).

### **1.2. Les principales prostanoïdes et leurs récepteurs.**

Les prostanoïdes sont des molécules importantes pour la régulation de plusieurs processus physiologiques et pathologiques [4]. Elles exercent leurs fonctions de façon autocrine ou paracrine principalement via l'interaction avec des récepteurs membranaires spécifiques couplés aux protéines G (RCPG) [5]. Le tableau I résume les rôles majeurs des récepteurs des principales prostanoïdes.



**Figure 1. Synthèse des principaux types d'eicosanoïdes.**

L'acide arachidonique, une fois libérée des membranes biologiques par la phospholipase A<sub>2</sub>, peut être converti de façon enzymatique en différents eicosanoïdes par les cyclo-oxygénases, les lipoxygénases ou les cytochromes P450. L'acide arachidonique peut aussi former des isoprostanes principalement par un processus d'oxygénation non enzymatique.

**Tableau I. Les récepteurs de prostanoides et leurs principales fonctions.**

Récepteur	Voie de signalisation	Fonctions	Références
EP <sub>1</sub>	↑ [Ca <sup>2+</sup> ]	Hyperalgésie	[6]
		Sécrétion gastrique de bicarbonate	[7,8]
		Carcinogénèse (formation de polypes)	[9]
		Excrétion urinaire de sodium	[10,11]
EP <sub>2</sub>	↑ [AMPc]	Hyperalgésie	[12]
		Arthrite (induite par le collagène)	[13]
		Pleurésie (induite par la carragénine)	[14]
		Ovulation et fertilisation de l'ovule	[15]
		Carcinogénèse (formation de polypes)	[16]
		Remodelage osseux	[17]
EP <sub>3</sub>	↓ [AMPc]	Hyperalgésie	[18,19]
		Fièvre	[20]
		Inflammation (œdème et pleurésie)	[14,21]
		Sécrétion duodénale de bicarbonate	[8,22]
		Contrôle du poids corporel	[23]
EP <sub>4</sub>	↑ [AMPc]	Carcinogénèse (prolifération tumorale)	[24]
		Arthrite (induite par le collagène)	[13]
		Carcinogénèse (formation de polypes)	[25]
		Remodelage osseux	[26,27]
DP <sub>1</sub>	↑ [AMPc]	Hyperalgésie	[28,29]
		Asthme allergique	[30]
		Vasodilatation cutanée (bouffé congestive)	[31]
DP <sub>2</sub>	↓ [AMPc]	Sommeil	[32]
		Chimiotactisme des leucocytes	[33]
IP	↑ [AMPc]	Inflammation allergique	[34,35]
		Homéostasie vasculaire (vasodilatation)	[36]
		Inflammation (œdème et pleurésie)	[14,37,38]
		Hyperalgésie	[6,19,38,39]
FP	↑ [Ca <sup>2+</sup> ]	Arthrite (induite par le collagène)	[13]
		Parturition	[40,41]
TP	↑ [Ca <sup>2+</sup> ]	Régulation de la pression intraoculaire	[42]
		Homéostasie vasculaire (vasoconstriction)	[36,43]
		Aggrégation plaquettaire	[43]

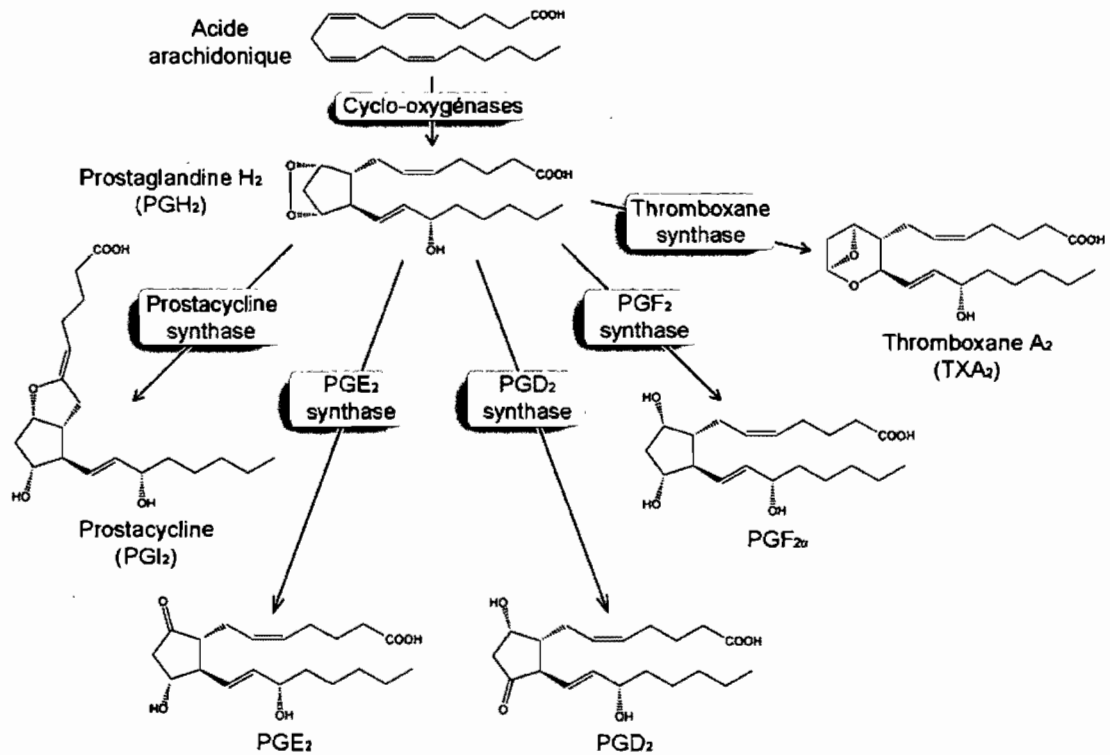
EP, récepteur de PGE<sub>2</sub>. DP, récepteur de PGD<sub>2</sub>. IP, récepteur de prostacycline. FP, récepteur de PGF<sub>2α</sub>. TP, récepteur de thromboxane.



Les prostanoïdes comprennent les prostaglandines (PG), la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) et les thromboxanes (TX). La synthèse des diverses prostanoïdes s'effectue à partir d'un intermédiaire commun, la  $\text{PGH}_2$ , qui est produite par l'action des cyclo-oxygénases (COX ou  $\text{PGH}_2$  synthases) sur l'acide arachidonique [44]. Les principales prostanoïdes sont la  $\text{PGE}_2$ , la  $\text{PGD}_2$ , la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , la prostacycline et le  $\text{TXA}_2$  (Fig. 2).

### 1.2.1. La $\text{PGE}_2$

La  $\text{PGE}_2$  est probablement la prostaglandine la plus étudiée à cause de son rôle dans les réactions inflammatoires ainsi que dans les réponses de fièvre et de douleur. En effet, des niveaux surélevés de  $\text{PGE}_2$  ont été mesurés dans divers modèles animaux d'inflammation [45-48]. De plus, des injections de  $\text{PGE}_2$  dans le cerveau ou dans l'espace intra-thécal de la colonne vertébrale causent respectivement de l'hyperalgésie [18] et une augmentation de la température corporelle [49] ou une exacerbation de l'œdème induite par la carragénine [50]. Chez l'humain, des niveaux élevés de  $\text{PGE}_2$  ont également été associés à certaines pathologies, telle l'arthrite [51]. Cependant, en plus de son rôle pro-inflammatoire, cette prostaglandine est aussi importante pour la régulation de différents processus homéostatiques. La  $\text{PGE}_2$  participe notamment au maintien de l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale en stimulant la sécrétion de mucus et de bicarbonate, en augmentant le flux sanguin à la muqueuse, ainsi qu'en inhibant la sécrétion d'acide gastrique [52-54]. La  $\text{PGE}_2$  peut aussi inhiber la lipolyse (conversion des triglycérides en acides gras libres) des adipocytes *in vitro* [55,56]. De plus, cette



**Figure 2. Voie de synthèse des prostanoides.**

Les cyclo-oxygénases transforment l'acide arachidonique en PGH<sub>2</sub> et toutes les prostanoides sont synthétisées à partir de ce substrat commun via l'activité des différentes prostanoides synthases.

prostaglandine est impliquée dans la régulation du remodelage osseux [26,27], dans la stimulation de l'excrétion du sodium au niveau rénal [10,11], ainsi que potentiellement dans la déstabilisation des plaques athérosclérotiques [57,58].

La PGE<sub>2</sub> active des récepteurs spécifiques à sept domaines transmembranaires qui sont couplés aux protéines G. Il existe quatre types de récepteurs de PGE<sub>2</sub> connus, soit les récepteurs EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> et EP<sub>4</sub> [59]. Différentes voies de signalisation sont stimulées suite à l'activation de ces divers récepteurs (tableau I).

#### **1.2.1.1. Le récepteur EP<sub>1</sub>**

Le gène du récepteur EP<sub>1</sub> humain code pour une protéine de 402 acides aminés [60]. L'ARNm de ce récepteur est fortement exprimé dans les reins [61,62], dans les poumons [62] et dans la muqueuse gastrique [59]. L'activation du récepteur EP<sub>1</sub> par la PGE<sub>2</sub> entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium [60]. Le couplage du récepteur EP<sub>1</sub> à la phospholipase C ne semble pas être responsable de cette augmentation du calcium intracellulaire, et il a été suggéré que l'entrée du calcium extracellulaire via un couplage à une protéine G non déterminée en serait plutôt la cause [63].

Le récepteur EP<sub>1</sub> joue un rôle dans la régulation de divers processus, tels la carcinogénèse, l'hyperalgésie thermique, la réponse au stress et la protection de la muqueuse gastrique [6-9,64-67]. En effet, les souris déficientes en EP<sub>1</sub> sont partiellement résistantes au développement de foyers de cryptes aberrantes dans le colon suivant l'administration d'un agent cancérigène, l'azoxyméthane [9,25]. Des rats traités avec des antagonistes du récepteur EP<sub>1</sub> développent aussi un nombre réduit de foyers de

cryptes aberrantes et d'adénocarcinomes dans le colon suivant l'administration d'azoxyméthane [66,67]. De plus, les souris  $EP_1^{-/-}$  sont insensibles à l'hyperalgésie thermique induite par l'injection de  $PGE_2$  dans la patte [6] et des rats traités avec un antagoniste du récepteur  $EP_1$  sont résistants à l'hyperalgésie mécanique induite par l'administration intrathécale de  $PGE_2$  [68] ou par la ligation du nerf sciatique [69]. Aussi, la sécrétion d'ACTH induite par une administration intrapéritonéale de LPS est inhibée dans les souris  $EP_1^{-/-}$  [64] et ces animaux répondent de façon atypique à différents stress en plus de démontrer une agressivité accrue par rapport aux souris contrôles [65]. Finalement, la sécrétion de bicarbonate induite par l'acide chlorhydrique est inhibée dans l'estomac de souris  $EP_1^{-/-}$  [7,8].

Chez le rat, il existe aussi un variant tronqué du récepteur  $EP_1$  qui peut lier la  $PGE_2$  avec une affinité comparable à celle du récepteur  $EP_1$ , mais qui n'induit pas d'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium [70]. Par contre, la co-expression de ce variant avec le récepteur  $EP_1$  fonctionnel résulte en une moins grande augmentation du calcium intracellulaire suite à la liaison de la  $PGE_2$  par rapport au récepteur  $EP_1$  seul [70]. De plus, ce variant d' $EP_1$  peut diminuer la signalisation par le récepteur  $EP_4$  [70]. Ces données suggèrent que le variant tronqué d' $EP_1$  pourrait agir comme dominant négatif lorsqu'il est exprimé conjointement avec d'autres récepteurs de prostaglandines.

#### **1.2.1.2. Le récepteur $EP_2$**

Le gène du récepteur  $EP_2$  humain code pour une protéine de 358 acides aminés [71]. Ce récepteur est exprimé fortement dans les poumons, le placenta et l'utérus

[71,72], mais il est moins abondant que le récepteur EP<sub>4</sub> dans la plupart des tissus [72]. Le récepteur EP<sub>2</sub> est couplé à la protéine G<sub>s</sub> et son activation suite à la liaison de la PGE<sub>2</sub> entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc [59,71]. Le récepteur EP<sub>2</sub> ne semble pas être désensibilisé suite à son activation [73].

L'étude de souris déficientes en récepteur EP<sub>2</sub> a révélé que ce récepteur était important pour la fertilité des femelles (ovulation et fertilisation de l'ovule) [15], pour l'hyperalgésie causée par l'inflammation [12], pour le développement de l'arthrite induite par le collagène (conjointement avec EP<sub>4</sub>) [13] ainsi que pour la formation de l'exsudat lors de la pleurésie induite par l'injection de carragénine [14]. De plus, quand des souris APC<sup>min</sup> (souris mutantes qui développent spontanément des polypes) sont croisées avec des souris EP<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, les doubles mutants résultants démontrent une réduction dans le nombre et la taille des polypes formés [16]. Finalement, l'administration d'un agoniste du récepteur EP<sub>2</sub> à des rats stimule la formation osseuse [17].

### 1.2.1.3. Les récepteurs EP<sub>3</sub>

Le récepteur EP<sub>3</sub> est principalement couplé à la protéine G<sub>i</sub> et son activation cause une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc [74]. Ce récepteur est exprimé abondamment dans les reins, l'utérus, le pancréas et l'estomac [75,76]. Plusieurs isoformes du récepteur EP<sub>3</sub> ont été identifiées: huit isoformes (I, II, III, IV, V, VI, e, f) chez l'humain [77,78] et trois isoformes (α, β, γ) chez la souris [79], toutes formées par épissage alternatif de l'ARNm [77]. Le rôle physiologique de ces diverses isoformes d'épissage n'est pas bien caractérisé, mais des différences ont été observées *in*

*in vitro* au niveau de la signalisation [76], de l'activité constitutive [80] et de l'internalisation [78] des différentes formes de récepteurs.

L'injection d'un agoniste du récepteur EP<sub>3</sub> dans l'hypothalamus de rats induit directement une hyperalgésie thermique [18] et les souris déficientes en EP<sub>3</sub> traitées au LPS sont moins sensibles à la douleur causée par l'injection intrapéritonéale d'acide acétique [19]. De plus, les souris EP<sub>3</sub><sup>-/-</sup> ne développent pas de fièvre suite à l'injection intracérébro-ventriculaire de PGE<sub>2</sub> ou suite à l'injection intraveineuse de LPS ou d'IL-1β [20]. Le récepteur EP<sub>3</sub> est aussi impliqué dans les réactions inflammatoires puisque l'exsudation observée lors de la pleurésie induite par la carragénine est réduite chez les souris EP<sub>3</sub><sup>-/-</sup> [14] et qu'un antagoniste du récepteur EP<sub>3</sub> réduit l'œdème causé par l'injection de PGE<sub>2</sub> dans la patte de souris normales [21]. Aussi, une croissance tumorale atténuée suite à la transplantation de cellules cancéreuses chez des souris EP<sub>3</sub><sup>-/-</sup> a été observée par rapport aux souris normales, et cette inhibition de croissance était accompagnée d'une angiogénèse diminuée [24]. Le récepteur EP<sub>3</sub> est important pour la protection de la muqueuse intestinale, puisque la sécrétion duodénale de bicarbonate induite par l'acide est réduite chez les souris EP<sub>3</sub><sup>-/-</sup> [8,22]. De plus, le récepteur EP<sub>3</sub>, tout comme EP<sub>1</sub>, est important pour la stimulation de la sécrétion d'ACTH suite à l'administration de LPS [64]. Finalement, une étude a récemment rapportée que les souris EP<sub>3</sub><sup>-/-</sup>, contrairement aux souris normales, deviennent obèses lorsqu'elles sont nourries *ad libitum* avec une diète à teneur normale en gras [23].

#### 1.2.1.4. Le récepteur EP<sub>4</sub>

Finalement, le récepteur EP<sub>4</sub>, tout comme EP<sub>2</sub>, est couplé à la protéine G<sub>s</sub> et son activation entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. Le gène du récepteur EP<sub>4</sub> humain code pour une protéine de 488 acides aminés [81]. Le récepteur EP<sub>4</sub> est exprimé dans plusieurs tissus et de façon prépondérante dans le petit intestin, l'utérus, le thymus et les poumons [59,81]. La région C-terminale du récepteur EP<sub>4</sub> est plus longue que celle du récepteur EP<sub>2</sub> et elle est riche en résidus sérines et thréonines [82,83]. Ces résidus peuvent être la cible de phosphorylation et pourraient être responsables de la plus forte désensibilisation du récepteur EP<sub>4</sub> par rapport à celle de EP<sub>2</sub> observée suite à l'activation prolongée par un ligand [73].

Les souris déficientes en récepteur EP<sub>4</sub> sont plus sujettes à développer des colites suite à l'administration de dextran sodium sulfate [84], ce qui suggère que ce récepteur est important pour le maintien de l'homéostasie intestinale. Aussi, les souris EP<sub>4</sub><sup>-/-</sup>, tout comme les souris EP<sub>1</sub><sup>-/-</sup>, sont partiellement résistantes au développement de foyers de cryptes aberrantes dans le colon suivant l'administration d'azoxyméthane [25]. De plus, ce récepteur est impliqué dans la stimulation par la PGE<sub>2</sub> de la croissance osseuse [26]. Le récepteur EP<sub>4</sub> est aussi impliqué dans la douleur puisque des antagonistes de ce récepteur ont des propriétés anti-hyperalgésiques chez le rat [28,29]. Finalement, le récepteur EP<sub>4</sub>, conjointement au récepteur EP<sub>2</sub>, joue un rôle dans le développement de l'arthrite induite par le collagène [13].

### 1.2.2. La PGD<sub>2</sub>

La PGD<sub>2</sub> est une prostaglandine produite en grande quantité par les mastocytes activés par les IgE [30,85] et qui joue un rôle important dans les réactions allergiques [30,86]. Cette prostaglandine est aussi impliquée dans la régulation du cycle sommeil-éveil [32,87] et peut causer des bouffées congestives (rougeur, chaleur et picotements ou démangeaisons au visage et au cou) [31,88]. La PGD<sub>2</sub> se lie au récepteur DP dont l'activation entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc [89]. Le gène du récepteur DP humain code pour une protéine de 359 acides aminés [89]. Ce récepteur est abondamment exprimé dans la rétine et dans l'intestin [89], ainsi que plus faiblement dans de nombreux autres tissus, dont le cerveau [90,91].

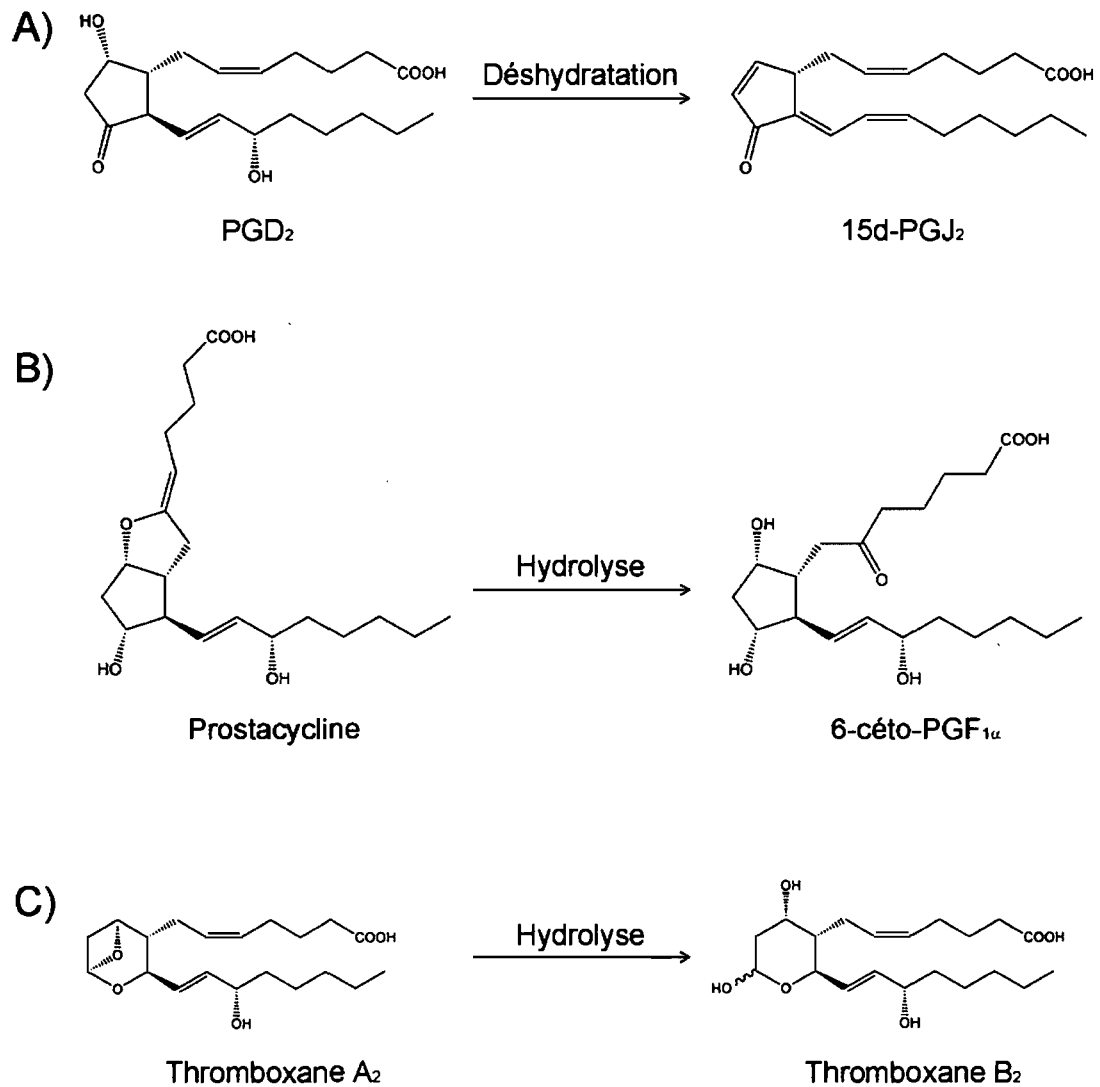
Les souris déficientes en récepteur DP ont une réponse allergique diminuée par rapport aux souris normales dans un modèle d'asthme induit par traitement avec de l'ovalbumine [30]. Plus récemment, il a été démontré que la PGD<sub>2</sub> pouvait aussi lier et activer le récepteur CRTH2 [33], un récepteur couplé aux protéines G membre de la famille des récepteurs de chimiokines [86]. Le récepteur CRTH2 (aussi connu sous le nom de DP<sub>2</sub> [4]) est abondamment exprimé à la surface des cellules T, des éosinophiles et des basophiles chez l'humain. Son activation par la PGD<sub>2</sub> entraîne une réponse chimiotactique [33]. Il a été démontré que l'activation de ce récepteur cause une exacerbation des phénotypes d'asthme induit par l'ovalbumine et de dermatite atopique chez des souris normales [35]. Les souris déficientes en récepteur DP<sub>2</sub> réagissent moins fortement dans différents modèles d'allergie inflammatoire de la peau [34]. Ces données suggèrent que le rôle de la PGD<sub>2</sub> dans les réactions allergiques est possiblement dû à l'action combinée de cette prostaglandine sur les récepteurs DP<sub>1</sub> et DP<sub>2</sub>.



La PGD<sub>2</sub> peut aussi être convertie de façon non enzymatique en 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>, Fig. 3A). La 15d-PGJ<sub>2</sub> peut lier et activer le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) *in vitro* et il a été proposé que la 15d-PGJ<sub>2</sub> puisse être un ligand endogène du PPAR $\gamma$  [92,93]. Il a aussi été suggéré que la 15d-PGJ<sub>2</sub> posséderait des propriétés anti-inflammatoires. Par exemple, la 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibe la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  par des fibroblastes synoviotiques [94] ainsi que l'expression de la COX-2 et la production d'oxyde nitrique par des macrophages activés [95]. La 15d-PGJ<sub>2</sub> peut aussi induire l'apoptose des lymphocytes T de souris, ce qui pourrait potentiellement réduire l'ampleur d'une réaction inflammatoire immunitaire [96]. De plus, la 15d-PGJ<sub>2</sub> est synthétisée *in vivo* chez la souris dans un modèle de péritonite induite par le zymosan et elle contribue, avec la PGD<sub>2</sub>, à la résolution de l'inflammation dans ce modèle [97]. Par contre, le mécanisme d'action de la 15d-PGJ<sub>2</sub> demeure controversé puisque celle-ci peut agir de façon dépendante ou indépendante du PPAR $\gamma$  [98].

### 1.2.3. La PGI<sub>2</sub>

La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) est un puissant vasodilatateur et un inhibiteur de l'agrégation des plaquettes [36,99,100] qui est synthétisée en grande quantité par les cellules endothéliales vasculaires [36,101]. Bien que la PGI<sub>2</sub> soit mieux connue pour son rôle dans la régulation du tonus vasculaire, cette prostaglandine est aussi impliquée dans bon nombre d'autres processus, dont la régulation de l'homéostasie rénale [102,103] et les phénomènes de douleur et d'inflammation [37-39]. La PGI<sub>2</sub>, qui est très



**Figure 3. Métabolisme non enzymatique de la PGD<sub>2</sub>, de la PGI<sub>2</sub> et du TXA<sub>2</sub>.**

A) Déshydratation de la PGD<sub>2</sub> en 15d-PGJ<sub>2</sub>, une prostanoïde possédant des propriétés anti-inflammatoires. B) Hydrolyse non enzymatique de la PGI<sub>2</sub> en un métabolite stable et inactif, la 6-céto-PGF<sub>1α</sub>. C) Hydrolyse non enzymatique du TXA<sub>2</sub> en TXB<sub>2</sub>.

instable dans les fluides biologiques, est rapidement convertie de façon non enzymatique en un métabolite stable et inactif, la 6-céto-PGF<sub>1α</sub> (Fig. 3B) [100]. La PGI<sub>2</sub> interagit avec le récepteur IP. Le récepteur IP humain compte 386 acides aminés [104-106]. Ce récepteur est fortement exprimé dans les reins, les poumons et les vaisseaux sanguins [104,106]. Le récepteur IP est couplé à la protéine G<sub>s</sub> et son activation par la prostacycline entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc [104,105], mais ce récepteur peut aussi se coupler à la phospholipase C en présence d'une concentration élevée de ligand [105].

Le rôle de la PGI<sub>2</sub> dans le maintien de l'homéostasie vasculaire a été confirmé par l'étude de souris déficientes en récepteur IP. Ces souris sont normotendues et leur fréquence cardiaque est normale [38]. Cependant, les souris IP<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles aux thromboses provoquées [38] et elles démontrent une augmentation de la prolifération vasculaire ainsi qu'une activation plaquettaire accrue dans un modèle de dénudation chirurgicale de l'endothélium de la carotide [36].

Les souris déficientes en récepteur IP sont aussi résistantes au développement d'œdème induit par la carragénine (dans la patte) [37,38] et elles semblent moins sensibles à l'injection intrapéritonéale d'acide acétique [38]. Récemment, l'implication de la PGI<sub>2</sub> dans des modèles d'inflammation chronique chez la souris a aussi été confirmée [39]. En effet, des souris traitées avec un antagoniste du récepteur IP ou des souris IP<sup>-/-</sup> sont résistantes au développement de l'arthrite dans des modèles d'arthrose et de polyarthrite rhumatoïde [39]. L'antagoniste du récepteur IP est efficace pour contrer le développement de la polyarthrite rhumatoïde seulement lorsque dosé de façon préventive (prophylaxie) et non de façon thérapeutique [39].

#### 1.2.4. La $\text{PGF}_{2\alpha}$

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est une prostaglandine très importante lors de la parturition car elle peut non seulement stimuler la contraction des muscles lisses de l'utérus [40], mais elle est aussi importante pour la lutéolyse du corps jaune chez la souris [41]. Elle est aussi synthétisée en grande quantité par les reins [107] où elle pourrait jouer un rôle dans la régulation du transport de l'eau au niveau du tubule collecteur [103]. La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  agit sur le récepteur FP. Le gène du récepteur FP humain code pour une protéine de 359 acides aminés [108]. L'activation du récepteur FP entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium [108]. Le récepteur FP est exprimé dans divers tissus dont les reins [109], les yeux [110], l'utérus [109] et les ovaires [109,111]. Deux isoformes différentes du récepteur FP ( $\text{FP}_A$  et  $\text{FP}_B$ ) provenant d'un épissage alternatif de l'ARNm ont été observées chez le mouton [112]. Ces deux isoformes répondent de façon similaire à l'activation par des ligands, mais l'isoforme  $\text{FP}_A$  possède une queue C-terminale plus longue que l'isoforme  $\text{FP}_B$  [112]. L'isoforme  $\text{FP}_A$  subit une internalisation suite à son activation par le ligand et non l'isoforme  $\text{FP}_B$ , qui semble être partiellement internalisée indépendamment de la présence ou non de ligand [113]. Plus récemment, un variant d'épissage du récepteur FP humain codant pour un récepteur tronqué qui ne peut plus lier la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  a été décrit [114].

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est essentielle pour la parturition de telle sorte que les souris déficientes en récepteur FP sont incapables de donner naissance naturellement, et ce malgré le fait que les embryons se développent normalement et que les souriceaux sont viables s'ils sont accouchés par césarienne [41]. De plus, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  joue un rôle dans la régulation de la pression intraoculaire. En effet, l'application topique de

latanoprost, un analogue de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et un agoniste du récepteur FP, cause une diminution de la pression intraoculaire chez les souris normales mais pas chez les souris déficientes en récepteur FP [42]. Le latanoprost (Xalatan<sup>®</sup>, Pfizer) est présentement utilisé pour le traitement du glaucome [115].

### 1.2.5. Les thromboxanes

Le thromboxane  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) est un vasoconstricteur et un stimulateur de l'agrégation des plaquettes qui joue un rôle opposé à celui de la prostacycline dans la régulation du tonus vasculaire [36]. Le  $\text{TXA}_2$  est très instable et il est rapidement converti non enzymatiquement en un métabolite stable, le  $\text{TXB}_2$  (Fig. 3C) [116]. Le  $\text{TXA}_2$  produit ses effets via l'activation du récepteur TP. Le gène du récepteur TP humain code pour deux isoformes différentes ( $\text{TP}\alpha$  et  $\text{TP}\beta$ ) qui sont produites par un épissage alternatif de l'ARNm [117]. Le récepteur  $\text{TP}\alpha$  possède 343 acides aminés [118], tandis que le récepteur  $\text{TP}\beta$  en possède 407 [117]. Chez la souris, un seul récepteur TP a été identifié jusqu'à présent et il est fortement exprimé dans le thymus, la rate, les poumons et les reins [119]. Le récepteur TP est couplé entre autres à la protéine  $\text{G}_q$  et son activation par le  $\text{TXA}_2$  induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium [117-120]. Aucune différence de signalisation entre les variants  $\alpha$  et  $\beta$  n'a été décelée [117], mais il a été démontré que le récepteur  $\text{TP}\beta$  est beaucoup plus internalisé suite au traitement avec du U-46619, un analogue stable du  $\text{TXA}_2$  [121].

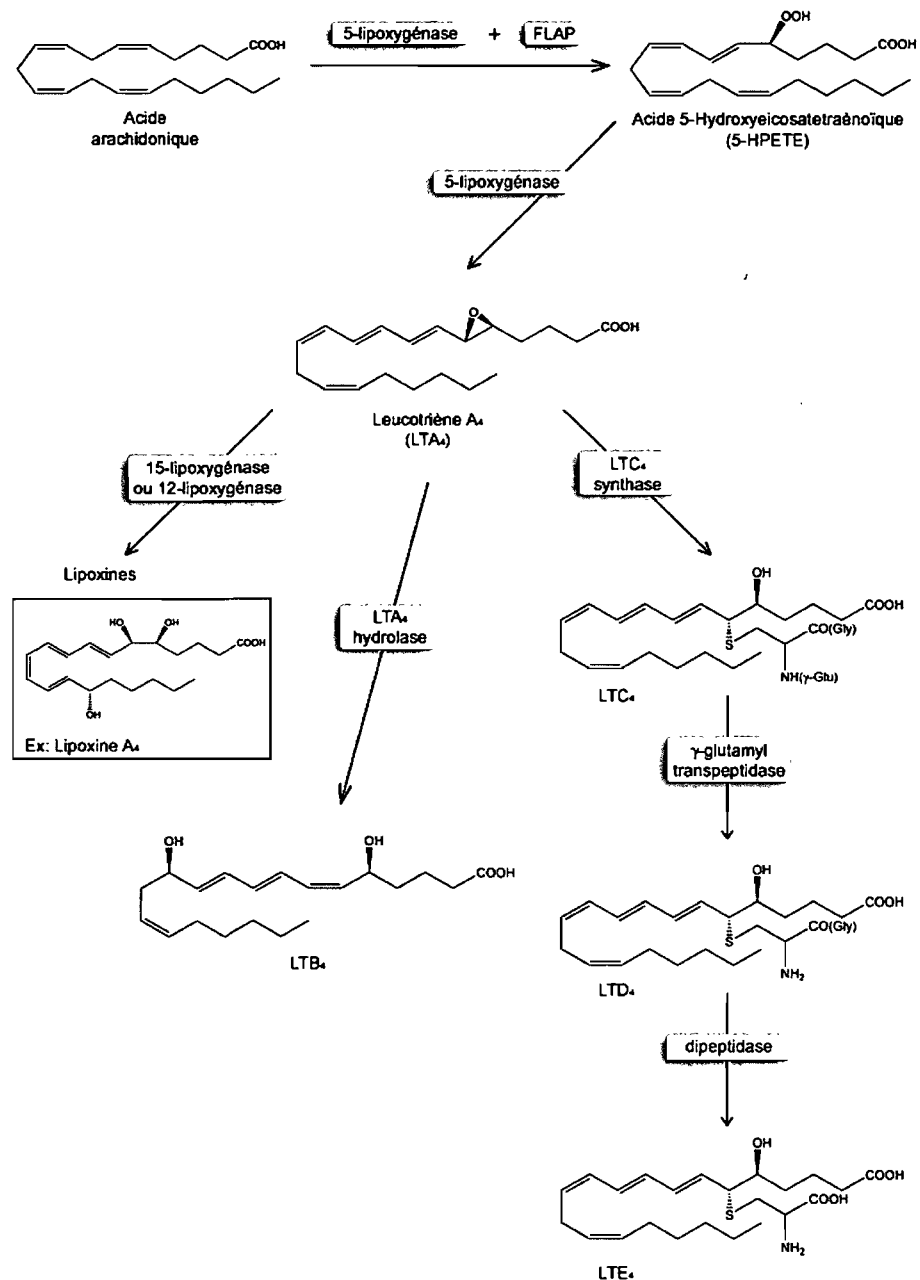
Le rôle du  $\text{TXA}_2$  dans la régulation de l'homéostasie vasculaire a été confirmé *in vivo* en étudiant des souris déficientes en récepteur TP. Ces animaux démontrent une

prolifération vasculaire et une activation plaquettaire diminuée suite à la dénudation de l'endothélium carotique [36]. De plus, le temps de saignement suite à une blessure est grandement prolongée chez les souris  $TP^{-/-}$  par rapport aux souris normales [43].

### 1.3. Les leucotriènes

Les leucotriènes (LT) sont principalement synthétisés par des cellules du système immunitaire, dont les macrophages et les leucocytes polynucléaires [4]. Ils sont produits via l'oxygénation de l'acide arachidonique par la 5-lipoxygénases (5-LO) et ils sont impliqués notamment dans la bronchoconstriction observée lors de crises d'asthme [122]. L'inhibition de la 5-LO à l'aide du zileuton (Zyflo<sup>®</sup>, Abbott Laboratories) [123] est utilisée comme stratégie thérapeutique pour le traitement de l'asthme [124]. Suite à l'activation des cellules par divers stimuli pro-inflammatoires, la 5-LO se relocalise du cytosol ou du noyau à l'enveloppe nucléaire [125] où elle peut catalyser la transformation de l'acide arachidonique libre en  $LTA_4$ , un époxyde instable qui sert de précurseur pour la formation des autres leucotriènes (Fig. 4).

La capacité de la 5-LO à produire du  $LTA_4$  est grandement dépendante de la présence de FLAP (5-lipoxygenase activating protein) [126,127], une protéine membre de la famille des MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) [128,129]. FLAP ne possède pas d'activité enzymatique en soit, mais des études ont suggérées qu'elle pourrait être impliquée dans le transfert de l'acide arachidonique à la 5-LO [130,131], ou encore qu'elle pourrait être importante pour la translocation de la 5-LO à la membrane nucléaire [132]. Des inhibiteurs de FLAP sont



**Figure 4. Voie de synthèse des leucotriènes.**

Le LTA<sub>4</sub> formé par la 5-lipoxygénase en présence de FLAP sert de précurseur à la synthèse des autres leucotriènes et peut aussi servir à la synthèse des lipoxines. La LTC<sub>4</sub> synthase conjugue du glutathion au LTA<sub>4</sub> pour former les cystéinyl-leucotriènes.

très efficaces pour empêcher la production cellulaire de leucotriènes, mais ils n'affectent que très peu la synthèse de ces molécules par la 5-LO purifiée [127,133]. En somme, bien que le mécanisme d'action précis de la FLAP n'ait pas encore été élucidé, il est clair qu'elle joue un rôle clé dans la synthèse des leucotriènes.

Une fois le  $LTA_4$  formé, il peut soit être hydrolysé en  $LTB_4$ , soit être conjugué au glutathion pour former des cystéinyl-leucotriènes (cys-LT) [4], autrefois connus sous le nom de SRS-A (slow-reacting substance of anaphylaxis) [134], ou encore être utilisé comme substrat pour former des lipoxines [135] (Fig. 4).

Le  $LTA_4$  est hydrolysé en  $LTB_4$  par l'action de la  $LTA_4$  hydrolase [136,137]. Le  $LTB_4$  agit comme un puissant agent chimiotactique des leucocytes et stimule l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales [122,138]. Le  $LTB_4$  remplit ces fonctions principalement via l'interaction avec le récepteur  $BLT_1$ , un récepteur couplé aux protéines G [139]. L'activation du récepteur  $BLT_1$  entraîne une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc et, à plus haute dose de  $LTB_4$ , une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium [139,140]. Un deuxième récepteur de  $LTB_4$  ( $BLT_2$ ), possédant une moins grande affinité pour le  $LTB_4$  ( $K_d = 23$  nM pour  $BLT_2$  vs. 1.1 nM pour  $BLT_1$ ), a récemment été caractérisé [141]. Contrairement au récepteur  $BLT_1$  qui est exprimé de façon préférentielle dans les leucocytes [139], le récepteur  $BLT_2$  est exprimé dans plusieurs tissus et types cellulaires, dont la rate, le foie, les ovaires et les leucocytes [141]. La fonction du récepteur  $BLT_2$  reste à déterminer.

Le  $LTA_4$  peut aussi être conjugué au glutathion pour former le  $LTC_4$  via l'action de la  $LTC_4$  synthase ( $LTC_4S$ ) [142,143], un autre membre de la famille des MAPEG [128]. Une fois à l'extérieur de la cellule, le  $LTC_4$  peut être converti en  $LTD_4$  ou  $LTE_4$



par la modification du glutathion conjugué [134,143]. Ces leucotriènes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> et LTE<sub>4</sub>), aussi nommés cystéinyl-leucotriènes (cys-LT), sont responsables des phénomènes de bronchoconstriction, de sécrétion accrue de mucus et d'œdème observés dans l'asthme [122]. Deux récepteurs de cys-LT existent, le CysLT<sub>1</sub> [144,145] et le CysLT<sub>2</sub> [146]. Le récepteur CysLT<sub>1</sub> est exprimé entre autres dans la rate, le colon, les poumons et les leucocytes [144,145] et le récepteur CysLT<sub>2</sub> est exprimé dans le cœur, la rate, les poumons et les leucocytes [146]. Dans les poumons, le récepteur CysLT<sub>1</sub> est exprimé au niveau des cellules musculaires lisses [144] où son activation par les cys-LT entraîne une bronchoconstriction tandis que le récepteur CysLT<sub>2</sub> est plutôt exprimé par les macrophages interstitiels [146]. L'activation du récepteur CysLT<sub>1</sub> est responsable de l'hyperréactivité bronchique causée par les cys-LT et des antagonistes du récepteur CysLT<sub>1</sub>, tels le montélukast (Singulair<sup>®</sup>, Merck) [147] et le zafirlukast (Accolate<sup>®</sup>, AstraZeneca) [148], sont utilisés pour le traitement de l'asthme [122,124]. De plus, le montélukast a récemment été approuvé pour le traitement des rhinites allergiques [149].

Enfin, le LTB<sub>4</sub> (via le récepteur BLT<sub>1</sub>) et les cys-LT (via les récepteurs CysLT<sub>1</sub> et CysLT<sub>2</sub>) peuvent stimuler le recrutement des monocytes et des leucocytes dans les parois des vaisseaux sanguins atherosclérotiques et ainsi contribuer à la pathogénèse de l'athérosclérose [122].

#### **1.4. Les lipoxines**

Les lipoxines (LX) sont des molécules formées par l'action séquentielle d'au moins deux lipoxygénases [150]. Les LX peuvent être synthétisées à partir de l'acide arachidonique via la 15-LO et la 5-LO [137] ou à partir du LTA<sub>4</sub> via la 12-LO [151]. La

synthèse de LX dépend donc généralement d'une interaction entre divers types cellulaires (synthèse transcellulaire), par exemple d'une interaction des neutrophiles avec les plaquettes ou les cellules épithéliales pulmonaires [135].

Des propriétés anti-inflammatoires et vasodilatatrices ont été attribuées aux LX [150,152-154] et il a été proposé que ces molécules jouent un rôle dans la résorption de l'inflammation [135]. Cependant, bien que la formation *in vitro* de ces molécules ait été caractérisée [137,151], les données en faveur d'une production de LX *in vivo* sont encore peu abondantes.

### 1.5. Les époxydes

L'acide arachidonique peut aussi servir de substrat à certains cytochromes P450 (CYP) pour former des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) ou des acides époxyeicosatriénoïques (EpETrE) [155-157]. Contrairement aux cyclo-oxygénases et aux lipoxygénases qui incorporent l'oxygène moléculaire à l'acide arachidonique activé, les CYP catalysent plutôt le transfert d'un seul atome d'oxygène activé sur le substrat [158]. Les EpETrE sont formés par les CYP 2B, 2C et 2J, tandis que les HETE sont principalement produits par le CYP 4A (16-, 17-, 18-, 19- ou 20-HETE) ou par des CYP qui restent à déterminer (5-, 8-, 9-, 11-, 12- ou 15-HETE) [155,158].

Les métabolites de l'acide arachidonique produits par les CYP ont été impliqués dans la régulation du tonus vasculaire. En effet, les EpETrE activent les canaux potassiques (BK<sub>Ca</sub>) des cellules musculaires lisses, ce qui cause une hyperpolarisation du muscle lisse et une vasodilatation [156,159], et des études ont suggérées que les EpETrE pourraient fonctionner comme un facteur hyperpolarisant dépendant de

l'endothélium (EDHF, endothelium-dependent hyperpolarizing factor) [160,161]. À l'opposé, le 20-HETE pourrait agir en tant que vasoconstricteur [162,163].

### **1.6. Les isoprostanes**

Finalement, l'acide arachidonique peut aussi être transformé de façon non enzymatique en isoprostanes [164,165]. Bien que la formation non enzymatique de produits d'oxygénation de l'acide arachidonique *in vitro* soit connue depuis au moins 25 ans [165], la formation *in vivo* des isoprostanes n'a été reconnue qu'il y a quelques années [166,167]. Depuis lors, la quantification non invasive des niveaux d'isoprostanes s'est établie comme un des meilleurs marqueurs du stress oxydatif *in vivo* [164,168,169]. En effet, les isoprostanes sont synthétisés par l'action de radicaux libres sur l'acide arachidonique estérifié dans les phospholipides membranaires et sont ensuite libérées des membranes et excrétées dans l'urine [167,169].

## CHAPITRE 2. LES ENZYMES RESPONSABLES DE LA SYNTHÈSE DES PROSTANOÏDES

### **2.1. Les phospholipases**

La première étape dans la voie de synthèse des prostaglandines est la libération de l'acide arachidonique estérifié en position sn-2 des phospholipides membranaires [3]. Les phospholipases responsables de l'hydrolyse de l'acide arachidonique des phospholipides sont les phospholipases A<sub>2</sub>, dont 15 groupes ont été identifiés [170]. Les PLA<sub>2</sub> sont classées en trois types majeurs: les PLA<sub>2</sub> sécrétées (sPLA<sub>2</sub>), les PLA<sub>2</sub> intracellulaires groupe VI qui fonctionnent indépendamment du calcium (iPLA<sub>2</sub> du groupe VI) et les PLA<sub>2</sub> cytosoliques du groupe IV (cPLA<sub>2</sub> du groupe IV) [170].

C'est la cPLA<sub>2</sub>α (groupe IVA) qui est l'enzyme principalement responsable de la libération de l'acide arachidonique servant à la synthèse des prostaglandines [171]. Cette phospholipase possède une sélectivité pour le clivage de l'acide arachidonique en position sn-2 avec une préférence d'environ 20 fois pour l'acide arachidonique par rapport à l'acide oléique [172]. Par contre, la cPLA<sub>2</sub>α ne discrimine pas le type de phospholipide qu'elle hydrolyse puisqu'elle libère l'acide arachidonique estérifié en position sn-2 de la glycéro-3-phosphocholine, de la glycéro-3-phosphoéthanolamine ou de la glycéro-3-phosphoinositol avec une efficacité comparable [173]. L'importance de la cPLA<sub>2</sub>α pour la libération de l'acide arachidonique servant à la synthèse de prostaglandines a été confirmée en étudiant des souris cPLA<sub>2</sub>α<sup>-/-</sup>. Ces dernières démontrent une inhibition quasi-totale de la production de PGE<sub>2</sub> induite par différents stimuli pro-inflammatoires [174,175].

La cPLA<sub>2</sub>α est activée par la liaison du calcium à son domaine C2 N-terminal [172,176]. L'augmentation du calcium intracellulaire suite à divers stimuli entraîne la translocation de la cPLA<sub>2</sub>α du cytosol vers les membranes péri-nucléaires, ce qui permet à l'enzyme de catalyser la libération de l'acide arachidonique [177]. De plus, la pleine activité de la cPLA<sub>2</sub>α est dépendante de la phosphorylation de certains résidus sérines par les MAPK (mitogen-activated protein kinases) [178,179] ou par la Ca<sup>2+</sup>/calmoduline kinase-II [180].

## 2.2. Les cyclo-oxygénases

Une fois libéré des membranes, l'acide arachidonique est converti en PGH<sub>2</sub>, qui sert de substrat commun pour la synthèse de toutes les autres prostaglandines. Les enzymes qui catalysent la formation de la PGH<sub>2</sub> sont les PGH<sub>2</sub> synthases [4]. L'acide arachidonique est d'abord transformé en PGG<sub>2</sub> par deux additions d'oxygène [44]. Cette étape est effectuée par l'activité cyclo-oxygénase des PGH<sub>2</sub> synthases et, pour cette raison, les PGH<sub>2</sub> synthases sont aussi connues sous le nom de cyclo-oxygénases (COX). Après sa formation, la PGG<sub>2</sub> est transférée au site peroxydase des COX et est convertie en PGH<sub>2</sub> [44]. Jusqu'à présent, deux isoformes majeures des COX ont été identifiées: COX-1, qui est principalement responsable de la synthèse constitutive des prostaglandines, et COX-2, qui est l'isoforme impliquée dans la synthèse accrue de prostaglandines observée dans les réactions inflammatoires [4,181]. D'autres variants des COX ont été identifiés [182], mais ces protéines ne participent probablement pas de façon importante à la synthèse de prostaglandines chez l'humain [183]. COX-1 et COX-2 sont très importantes d'un point de vue thérapeutique car elles sont la cible des

médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) [184]. Les propriétés anti-plaquettaires de l'acide acétylsalicylique (AAS) sont dues à l'inhibition de COX-1 [185] tandis que les propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques des AINS sont dues à l'inhibition de COX-2 [186].

### **2.2.1. COX-1**

La COX-1 est la première cyclo-oxygénase à avoir été caractérisée. Elle a été purifiée il y a plus de 25 ans à partir de vésicules séminales de mouton [187]. Le gène de la COX-1 humaine se situe sur le chromosome 9 (9q32-q33.3) [188] et il code pour une glycoprotéine de 599 acides aminés qui contient un groupement hème [181,189]. COX-1 est une protéine membranaire qui est localisée dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans les membranes de l'enveloppe nucléaire [190]. COX-1 est exprimée dans la plupart des tissus et types cellulaires de façon constitutive et son expression est en général peu altérée en fonction des divers états d'activation des cellules [191]. C'est donc cette enzyme qui est majoritairement responsable de la synthèse constitutive des prostaglandines requises pour la régulation des processus homéostatiques.

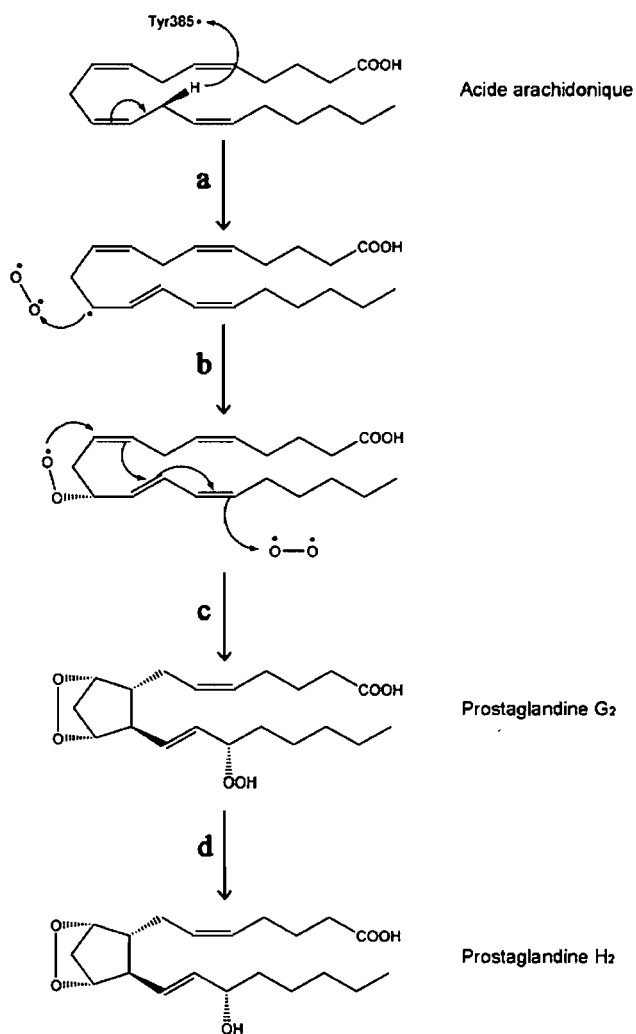
#### **2.2.1.1. Structure tridimensionnelle et mécanisme réactionnel de la COX-1**

Des études de cristallographie et de diffraction des rayons X ont démontré que COX-1 existe sous forme de dimère [192]. Chaque sous-unité du dimère de COX-1 possède un site cyclo-oxygénase et un site peroxydase [181,192]. Le site peroxydase, qui contient le groupement hème, se trouve près de la surface de la protéine tandis que le site cyclo-oxygénase est enfoui au cœur de l'enzyme, au haut d'un tunnel hydrophobique

par lequel le substrat et les inhibiteurs y sont acheminés [181]. Les deux sites actifs distincts peuvent fonctionner indépendamment l'un de l'autre dans certaines conditions [193]. Cependant, pour catalyser l'addition des molécules d'oxygènes sur l'acide arachidonique, le site cyclo-oxygénase doit préalablement être activé par la réduction d'un hydroperoxyde au site peroxydase [194]. En effet, la réduction d'un hydroperoxyde en alcool par COX-1 entraîne une oxydation du groupement hème contenu dans son site peroxydase et la réduction de cet hème oxydé provoque ensuite la formation d'un radical sur la tyrosine 385 [181]. C'est ce radical qui débute la réaction de cyclo-oxygénation en retirant un proton de l'acide arachidonique dans le site cyclo-oxygénase de COX-1, ce qui cause la formation d'un radical sur l'acide arachidonique [44]. L'acide arachidonique radicalaire réagit ensuite avec une première molécule d'oxygène et le complexe ainsi formé se réarrange pour former un cycle (l'endoperoxyde), tout en réagissant avec une seconde molécule d'oxygène pour produire la PGG<sub>2</sub> (Fig. 5). Une fois formée, la PGG<sub>2</sub> est réduite en PGH<sub>2</sub> par l'activité peroxydase de COX-1 [181]. Lorsque la PGG<sub>2</sub> est produite en quantité suffisante, elle peut servir à initier d'autres cycles de cyclo-oxygénation de l'acide arachidonique [194].

### **2.2.2. COX-2**

Ce n'est que plus récemment, vers le début des années 1990, que la COX-2 a été identifiée [195-197]. Le gène de la COX-2 humaine provient du chromosome 1 (1q25.2-q25.3) [188] et il code pour une hémoglycoprotéine de 604 acides aminés qui



**Figure 5. Mécanisme de cyclo-oxygénation de l'acide arachidonique.**

La première étape consiste en l'abstraction du proton en position 13 de l'acide arachidonique par la Tyr385 activée du site actif, ce qui conduit à la formation d'un radical en position 11 (a). Ensuite, l'acide arachidonique radicalaire réagit avec une première molécule d'oxygène (b) et le complexe ainsi formé se cyclise tout en réagissant avec une seconde molécule d'oxygène pour former la  $PGG_2$  (c). La  $PGG_2$  est convertie en  $PGH_2$  par l'action peroxydase des COX (d). Adapté de: [44,181].



est environ 60% identique à COX-1 au niveau de la séquence primaire [198]. Tout comme COX-1, la COX-2 est exprimée dans le réticulum endoplasmique et dans les membranes de l'enveloppe périmoléculaire [190]. La COX-2 catalyse la même réaction que la COX-1 en suivant le même mécanisme réactionnel. Cependant, de fines différences entre les isoformes existent au niveau de l'utilisation du substrat et de l'activation par les peroxydes. En effet, la COX-2 nécessite de moins grandes concentrations d'hydroperoxydes pour initier son cycle catalytique [194,199] et elle démontre une meilleure efficacité de synthèse de  $\text{PGH}_2$  par rapport à COX-1 lorsque l'apport en acide arachidonique est limité [200,201]. La COX-1, et non la COX-2, est activée de façon coopérative par l'acide arachidonique [200,202]. L'absence de coopérativité de COX-2 pour l'acide arachidonique s'explique par son activation par de plus faibles concentrations d'hydroperoxydes, c'est-à-dire que les faibles quantités de  $\text{PGG}_2$  formées quand l'apport en acide arachidonique est limité sont suffisantes pour stimuler une autre ronde de catalyse par COX-2, mais pas par COX-1 [202]. À l'inverse, l'addition d'hydroperoxyde élimine la coopérativité de COX-1 et permet une meilleure utilisation des faibles concentrations d'acide arachidonique par cette isozyme [202]. L'activité relative des deux COX dépend donc à la fois de la concentration des hydroperoxydes et de l'acide arachidonique. Ces propriétés font que la COX-2 peut être la principale source de PG dans les conditions où l'apport en acide arachidonique et en hydroperoxyde est limité, et ce même en présence de COX-1 [201].

La COX-2 n'est pas exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus sains, mais son expression est facilement et grandement inductible par divers stimuli tels les facteurs de croissance, les cytokines et le LPS [191]. Cette isozyme des COX est

responsable de la synthèse accrue de prostaglandines observée lors des réactions inflammatoires, mais elle ne participe pas significativement à la synthèse des prostaglandines requises pour le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastrique [195]. Puisque les AINS, qui inhibent les cyclo-oxygénases, peuvent causer des lésions gastro-intestinales et que c'est la COX-1 qui est principalement responsable de la synthèse des PG au niveau gastrique, le développement d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2 a rapidement suivi la découverte de cette isozyme. Ces nouveaux anti-inflammatoires ont une activité analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire comparable aux anti-inflammatoires non stéroïdiens traditionnels, mais ils possèdent une meilleure tolérabilité gastro-intestinale [195]. Cependant, la COX-2 est induite dans divers modèles animaux de lésions gastriques et les coxibs peuvent ralentir la guérison de ces lésions [203,204].

#### **2.2.2.1. Structure tridimensionnelle de COX-2**

Malgré leurs origines chromosomales différentes, la COX-1 et la COX-2 ont des structures tridimensionnelles pratiquement superposables [205,206]. La différence la plus importante entre les deux isozymes est un site cyclo-oxygénase plus spacieux dans la COX-2 par rapport à la COX-1 [205,206]. Cet élargissement du site actif de COX-2 est dû principalement au remplacement des isoleucines 434 et 523 par des valines, ce qui a pour effet non seulement d'augmenter l'espace à l'intérieur du site actif mais aussi d'ouvrir l'accès à une poche latérale au fond de laquelle se trouve un résidu arginine (Arg513). Ce sont ces différences au niveau des sites actifs des cyclo-oxygénases qui ont permis l'obtention des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 [184].

### **2.2.2.2. Voies de signalisation impliquées dans l'induction de la COX-2**

L'expression de la COX-2 est induite au niveau transcriptionnel par divers stimuli pro-inflammatoires, notamment par le LPS, l'IL- $\beta$  et le TNF- $\alpha$  [181], et elle est grandement inhibée par les glucocorticoïdes [207]. On retrouve plusieurs sites de liaison pour divers transactivateurs dans le promoteur de COX-2, incluant un site AP-1, un site CRE (cAMP response element), un site de liaison pour C/EBP (CCAAT/Enhancer binding protein) et deux sites  $\kappa$ B [208]. Le site CRE est indispensable pour l'expression basale et inductible de COX-2 puisque la mutation de cet élément rend le promoteur complètement silencieux [209]. Les voies de signalisation menant à l'induction de COX-2 sont variées et elles diffèrent selon le type cellulaire ou le stimulus [181]. COX-2 peut notamment être induite par la voie des MAPK [210,211], de NF- $\kappa$ B [211,212] et de C/EBP [212,213]. Par exemple, l'IL-1 $\beta$  induit la transcription de COX-2 dans des cellules amniotiques en entraînant le recrutement de C/EBP- $\beta$  au site C/EBP dans le promoteur [213]. Par contre, l'induction de COX-2 dans des fibroblastes humains par le TNF- $\alpha$  est plutôt associée à une augmentation de la liaison de NF- $\kappa$ B aux deux sites  $\kappa$ B dans le promoteur [214].

### **2.2.2.3. Implication de la COX-2 dans diverses pathologies**

La COX-2 joue un rôle important dans plusieurs pathologies, plus particulièrement dans les phénomènes d'inflammation, de douleur et de fièvre. En effet, COX-2 est induite par plusieurs stimuli pro-inflammatoires dans divers types cellulaires, et son induction est responsable de la synthèse accrue de PGE<sub>2</sub> dans ces modèles [181]. Des niveaux d'expression élevés de COX-2 ont été observés dans plusieurs modèles

animaux d'inflammation, incluant des modèles d'œdème induite par la carragénine [47,215], de fièvre induite par le LPS [216,217] et d'arthrite induite par l'adjuvant [46,218]. L'expression de la COX-2 est aussi induite dans le cartilage de patients atteints d'arthrose [219] et dans le tissu synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [220].

En plus de son implication dans les réactions inflammatoires, la COX-2 pourrait aussi jouer un rôle dans la carcinogénèse. Une expression élevée de COX-2 a été observée dans différents types de cancers, notamment dans les cancers colorectaux [221-223], les cancers de l'œsophage [224] et les cancers du pancréas [225]. De plus, l'administration d'inhibiteurs de COX-2 est associée à une diminution du développement de certains cancers, plus particulièrement des cancers colorectaux [226].

Une expression augmentée de la COX-2 a aussi été observée dans le cerveau de patients atteints d'Alzheimer [227] et des études épidémiologiques ont suggéré que le risque de développer la maladie d'Alzheimer était moindre chez les patients prenant des AINS [228]. Ces données suggèrent que la COX-2 pourrait aussi être impliquée dans le développement de l'Alzheimer, mais un éventuel bénéfice des inhibiteurs de COX-2 dans la prévention de l'Alzheimer reste à démontrer [228]. Par ailleurs, les coxibs sont inefficaces pour ralentir la progression de la maladie d'Alzheimer existante [229,230].

#### **2.2.2.4. Expression constitutive de la COX-2**

Bien que la COX-2 ne soit habituellement pas exprimée de façon constitutive, elle est tout de même détectable dans certains tissus ou types cellulaires particuliers en absence d'inflammation. En effet, des études ont montré que la COX-2 est notamment

exprimée de façon constitutive dans le cerveau [231], dans les reins [232] et dans les poumons [233]. La fonction de la COX-2 constitutive dans ces différents tissus n'est pas bien connue. Par contre, il a été proposé que la COX-2 constitutivement exprimée dans les reins soit impliquée dans la régulation de l'irrigation rénale [234] et de l'excrétion d'eau et de sel [232,234]. En effet, les inhibiteurs sélectifs de COX-2, tout comme les AINS traditionnels, peuvent entraîner une baisse de l'excrétion urinaire de sel, une rétention de fluide et une augmentation de la pression sanguine chez des sujets en santé [235,236].

### **2.2.3. Autres variants des cyclo-oxygénases**

Finalement, plusieurs variants d'épissage des cyclo-oxygénases ont été observés [182]. Le rôle des différents variants des COX n'est pas bien connu, même que l'existence des protéines encodées par la plupart de ces variants n'a pas été démontrée. Cependant, un variant d'épissage particulier de COX-1, nommé COX-3, a attiré beaucoup d'attention. Ce variant, découvert originalement chez le chien, est identique à COX-1 sauf que l'intron 1 n'est pas épissé de l'ARNm, ce qui cause une insertion de 30 acides aminés dans la protéine produite [237]. L'insertion de ces 30 acides aminés s'effectue en amont du peptide signal en N-terminal de la protéine et n'affecte pas son expression ni sa glycosylation [237]. En effet, l'expression ectopique de la COX-3 de chien dans des cellules Sf9 a démontré que ce variant de COX-1 était catalytiquement actif (environ 20% de l'activité de COX-1) [237]. Curieusement, la COX-3 est légèrement plus sensible à l'inhibition par l'acétaminophène que COX-1 ou COX-2 et il a été proposé que l'inhibition de la COX-3 dans le cerveau puisse expliquer les effets

thérapeutiques de l'acétaminophène [237]. Des ARNm de COX-1 ayant conservé leur intron 1 ont aussi été observés chez le rat, la souris et l'humain [183,237-239]. Par contre, la rétention de l'intron 1 dans l'ARNm de ces espèces a pour effet de changer le cadre de lecture de la séquence codante, ce qui est incompatible avec la production d'une protéine fonctionnelle [183,238,239]. Pour cette raison, une protéine COX-3 complète et catalytiquement active n'a pas été détectée chez ces espèces et il est peu probable qu'elle y joue un rôle important dans la synthèse de prostaglandines.

#### **2.2.4. Phénotypes des souris déficientes en cyclo-oxygénases**

Des souris déficientes en COX-1 (COX-1<sup>-/-</sup>) ou COX-2 (COX-2<sup>-/-</sup>) ont été générées et leurs phénotypes ont été caractérisés [240-242]. L'agrégation des plaquettes ainsi que la synthèse basale de PGE<sub>2</sub> par des macrophages de souris COX-1<sup>-/-</sup> est grandement diminuée [240]. Les souris COX-1<sup>-/-</sup> ne développent pas spontanément des lésions gastriques, mais elles semblent être plus sensibles aux effets gastriques néfastes de l'indométhacine [240]. Finalement, bien que les souris COX-1<sup>-/-</sup> soient viables, les souriceaux provenant d'un accouplement entre des mâles et des femelles COX-1<sup>-/-</sup> ne survivent pas [240].

De leur côté, les souris COX-2<sup>-/-</sup> femelles sont infertiles [242]. De plus, les souris COX-2<sup>-/-</sup> démontrent de graves anomalies au niveau rénal qui peuvent entraîner une mort prématurée [241,242]. Les reins de ces souris sont sous-développés et ils possèdent peu de néphrons fonctionnels [241,242]. La COX-2 semble donc importante pour le développement normal du rein chez la souris. La COX-2 est aussi impliquée dans l'induction de la synthèse de PGE<sub>2</sub> puisque des fibroblastes COX-2<sup>-/-</sup> stimulés au

sérum ou des macrophages COX-2<sup>-/-</sup> stimulés au LPS produisent moins de PGE<sub>2</sub> par rapport aux cellules provenant de souris normales [241,242]. De plus, les souris COX-2<sup>-/-</sup> sont résistantes à la fièvre induite par l'injection intrapéritonéale de LPS [243] et au développement de l'arthrite induite par l'injection de collagène ou d'anticorps anti-collagène [244]. Cependant, la réponse inflammatoire des souris COX-2<sup>-/-</sup> n'est pas différente des souris normales dans d'autres modèles d'inflammation, tels l'œdème de l'oreille induite par l'application topique d'acide arachidonique ou de phorbol-12-tétradécanoyl-13-acétate [241,242] et l'œdème de la patte induite par l'injection de carragénine [242].

Cependant, une induction compensatoire des COX a été démontrée dans différents tissus et types cellulaires des souris déficientes en COX-1 ou COX-2 [245,246], ce qui complique l'interprétation du rôle de chaque isozyme. En effet, comparativement à des souris normales, les ARNm de COX-1 et de COX-2 sont exprimés à des niveaux plus élevés dans le cerveau et dans les macrophages péritonéaux des souris COX-2<sup>-/-</sup> et COX-1<sup>-/-</sup>, respectivement [245]. Cette induction compensatoire des COX varie en fonction du tissu ou du type cellulaire. Par exemple, la COX-1 est induite dans le foie de souris COX-2<sup>-/-</sup>, et non le contraire [245]. Une augmentation des niveaux de PGE<sub>2</sub> a aussi été observée dans les foies de souris COX-2<sup>-/-</sup> par rapport aux souris normales [245], ce qui démontre que l'induction compensatoire des COX peut affecter la capacité de synthèse de prostaglandines de cellules et tissus. De plus, dans les souris déficientes en COX, principalement dans les souris COX-1<sup>-/-</sup>, il y a aussi une augmentation des niveaux d'expression de l'ARNm de la cPLA<sub>2</sub> dans les macrophages péritonéaux [245]. En somme, les souris déficientes en COX-1 ou COX-2 ne sont

possiblement pas le meilleur modèle pour déterminer les rôles précis de chaque isozyyme.

### **2.3. Les prostanoïdes synthèses terminales**

La  $\text{PGH}_2$  formée par les COX est ensuite convertie en diverses prostanoïdes par différentes prostanoïdes synthèses (ou synthèses terminales). Chaque prostanoïde majeure est produite par l'action d'une ou de divers synthèses terminales spécifiques [4]. La capacité d'une cellule à former un type de prostanoïde en particulier est donc dépendante de la présence et du niveau d'expression des prostanoïdes synthèses. Jusqu'à présent, plusieurs de ces synthèses terminales ont été identifiées et caractérisées, les plus importantes dans le cadre de nos travaux étant la  $\text{PGE}_2$  synthase membranaire de type 1 (mPGES-1) et la prostacycline synthase (PGIS).

#### **2.3.1. Les $\text{PGE}_2$ synthèses**

Les enzymes responsables de la synthèse de  $\text{PGE}_2$  à partir de la  $\text{PGH}_2$  sont les  $\text{PGE}_2$  synthèses (PGES). Ces enzymes catalysent l'isomérisation de la fonction 9,11-endoperoxyde de la  $\text{PGH}_2$  en fonctions 9-céto et 11-hydroxy (voir fig. 2). Il existe trois principales PGES: la PGES microsomale de type 1 (mPGES-1), la mPGES-2 et la PGES cytosolique (cPGES). En plus de ces trois PGES, il existe aussi d'autres protéines qui peuvent catalyser la formation de  $\text{PGE}_2$ . Le tableau II résume les propriétés physiques et catalytiques des trois PGES principales.



**Tableau II. Propriétés physiques et catalytiques des PGES majeures.**

Enzyme	Localisation cellulaire	Expression	Co-facteur	$K_m$ PGH <sub>2</sub> (μM)	Activité spécifique (μmol PGE <sub>2</sub> /min/mg protéine)
mPGES-1	Membranaire	Constitutive et inductible	GSH	14 <sup>a</sup> – 160 <sup>b</sup>	4 <sup>a</sup> – 120 <sup>b</sup>
mPGES-2	Membranaire	Constitutive	GSH DTT thiols	28 <sup>c</sup>	3.3 <sup>c</sup>
cPGES	Cytosolique	Constitutive	GSH	nd	nd

<sup>a</sup>, déterminés à 4°C, tiré de [247]

<sup>b</sup>, déterminés à 37°C, tiré de [248]

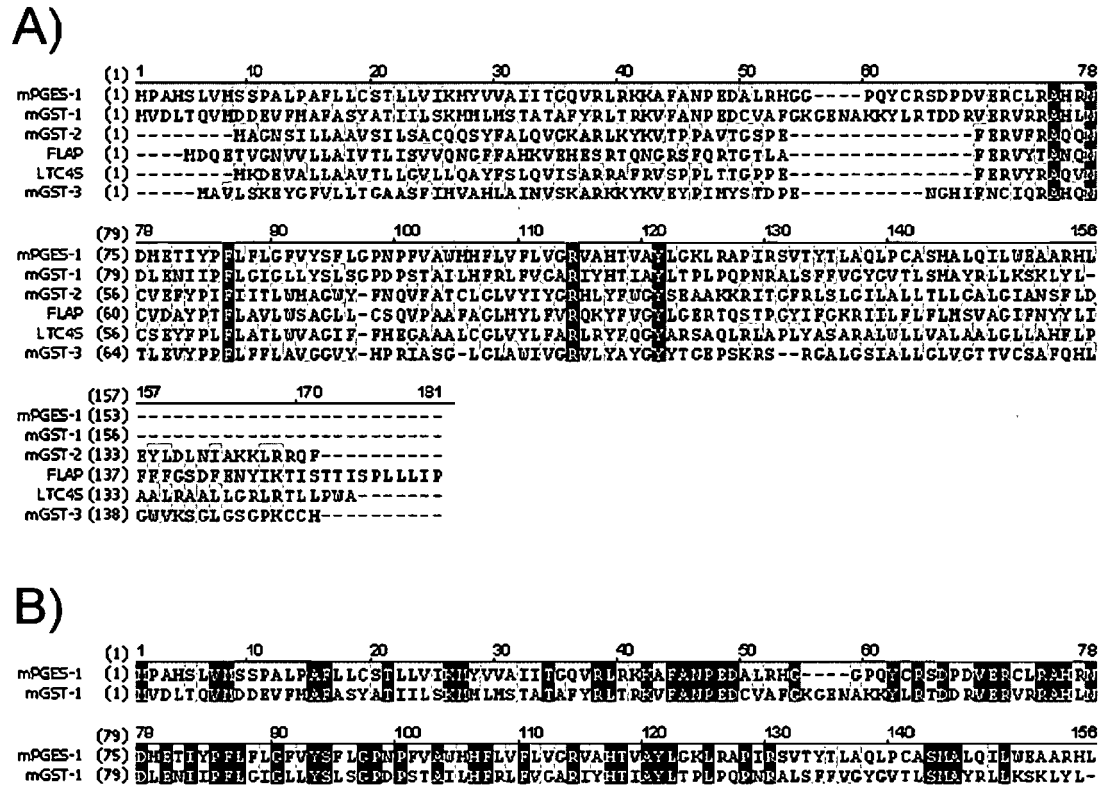
<sup>c</sup>, tiré de [249]

nd, information non disponible.

### 2.3.1.1. mPGES-1

La mPGES-1 est la première PGES à avoir été isolée et caractérisée vers la fin des années 1990 [250]. Cette enzyme est un membre de la famille des MAPEG, dont font aussi partie la mGST1, la FLAP et la LTC<sub>4</sub>S [129], entre-autres. Un alignement de séquence des différentes protéines membres de la famille des MAPEG révèle que la mGST1 est la protéine la plus similaire à la mPGES-1 (Fig. 6) et, en fait, à l'origine la mPGES-1 avait été nommée mGST1-L1 (mGST-1 like-1) [128,250]. Le gène de la mPGES-1 humaine provient du chromosome 9 (9q34.3) [251] et code pour une petite protéine membranaire de 152 acides aminés [250] localisée dans le réticulum endoplasmique et dans les membranes péri-nucléaires [252].

Peu après son identification, la mPGES-1 a été purifiée et caractérisée [247,248]. Cette enzyme requiert la présence de GSH pour catalyser la formation de PGE<sub>2</sub> et



**Figure 6. Alignement de séquence des protéines humaines membres de la famille des MAPEG.**

A) Les séquences primaires des six protéines humaines membres de la famille des MAPEG sont alignées. Les résidus identiques sont indiqués sur fond noir et les résidus conservés sont sur fond gris. B) Alignement de la mPGES-1 avec son plus proche homologue, la mGST-1. Les deux protéines sont environ 37% identiques et 55% similaires.

possède un  $K_m$  moyennement élevé pour la  $PGH_2$  (14-160  $\mu M$ ) et une activité spécifique de 4 ou 120  $\mu mol/min/mg$  protéine à 0 ou 37°C, respectivement [247,248]. La mPGES-1 possède aussi de plus faibles activités de GST (0.17  $\mu mol/min/mg$  protéine) et de GSH peroxydase (0.81  $\mu mol/min/mg$  protéine) [248].

#### **2.3.1.1.1. Structure de la mPGES-1**

L'analyse d'hydrophobicité de la mPGES-1 purifiée suggère que cette protéine possède 4 domaines transmembranaires [128] et des études de cristallographie et de diffraction des électrons qu'elle possède une structure homotrimérique [248]. Cette organisation proposée de la mPGES-1 est très similaire à la structure de la mGST1 obtenue par cristallographie et diffraction des électrons [253] et aussi aux récentes structures de la FLAP [254] et de la  $LTC_4S$  [255,256] déterminées par cristallographie et diffraction des rayons X. Cependant, la structure exacte de la mPGES-1 n'est pas connue.

#### **2.3.1.1.2. Expression constitutive et inductible de la mPGES-1**

En général, l'expression de la mPGES-1 est plutôt faible dans les tissus d'animaux non traités [250], mais elle est tout de même exprimée constitutivement dans quelques tissus, notamment les poumons, les reins, la rate, l'estomac, la prostate, la vessie et les organes génitaux [250,257,258]. La mPGES-1, tout comme COX-2, est une protéine facilement inductible dans la plupart des tissus et types cellulaires par différents stimuli, tels le LPS, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  [259-262]. En effet, COX-2 et mPGES-1 sont induites de façon coordonnée dans plusieurs modèles [46,47,260-263].

Par exemple, la stimulation de cellules A549 par le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  induit l'expression de la COX-2 et de la mPGES-1, et l'induction de ces deux protéines est complètement inhibée par la dexaméthasone [207,262].

Il a été démontré que l'induction de la mPGES-1 dans des macrophages de souris par le LPS procédait via l'activation du récepteur TLR4, de MyD88 et du facteur de transcription NF-IL6 (aussi appelé C/EBP- $\beta$ ) [48]. La voie de signalisation du NF- $\kappa$ B peut aussi entraîner une induction de la mPGES-1 [264]. De plus, les MAPK p38 et ERK semblent importantes pour l'induction de la mPGES-1 par l'IL-1 $\beta$  dans les fibroblasts orbitaux [260]. Finalement, un rôle de la PGE<sub>2</sub> dans la stimulation de l'expression de la mPGES-1 a aussi été démontré. En effet, l'induction de la mPGES-1 par l'IL-1 $\beta$  dans des fibroblastes synoviotiques est inhibée par des AINS, et cette inhibition est renversée par l'ajout de PGE<sub>2</sub> ou par des agonistes des récepteurs EP<sub>2</sub> ou EP<sub>4</sub> [265].

À l'opposé, il a été démontré que l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  pouvait inhiber l'induction de la mPGES-1 par l'IL-1 $\beta$  [266,267]. De plus, l'activité enzymatique de la mPGES-1 est aussi directement inhibée par la 15d-PGJ<sub>2</sub> [268]. Ces propriétés de la 15d-PGJ<sub>2</sub> pourraient expliquer les effets anti-inflammatoires observés dans certaines conditions.

#### **2.3.1.1.4. Implication de la mPGES-1 dans différentes pathologies**

Puisque la mPGES-1 est induite par plusieurs stimuli pro-inflammatoires et que la PGE<sub>2</sub> est une prostaglandine impliquée dans les réactions de fièvre, de douleur et d'inflammation, le rôle de la mPGES-1 dans l'inflammation a rapidement été proposé.

L'induction de la mPGES-1 par des cytokines ou du LPS a été observée dans divers types cellulaires, tels les macrophages et les cellules synoviales [259,261,269]. De plus, l'expression de la mPGES-1 est aussi stimulée dans plusieurs modèles animaux d'inflammation, incluant des modèles de fièvre induite par le LPS [218] et d'arthrite induite par l'adjuvant [46]. De façon intéressante, l'induction de la mPGES-1 par l'injection de carragénine ou de LPS est observée dans les tissus périphériques ainsi que dans la moelle épinière et le cerveau [47], ce qui suggère que cette enzyme est impliquée non seulement dans les réactions inflammatoires locales, mais aussi au niveau du système nerveux central. Une forte expression de la mPGES-1 a été observée dans le tissu synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [270] et une élévation de la mPGES-1 a aussi été observée dans le cartilage de patients souffrant d'arthrose [267]. En somme, l'ensemble de ces données suggère que la mPGES-1 est une des enzymes responsables, avec COX-2, de la synthèse élevée de PGE<sub>2</sub> qui survient dans les conditions inflammatoires.

Il a été proposé que la mPGES-1, en plus de son implication dans les réactions inflammatoires, puisse jouer un rôle dans le cancer. En effet, la mPGES-1 est surexprimée dans certains types de cancer. Par exemple, dans un échantillonnage de tissus pulmonaires cancéreux (non-small cell lung cancer) et normaux, la mPGES-1 était induite dans 80% des tissus cancéreux [271]. Par contre, la production accrue de PGE<sub>2</sub> causée par la surexpression de la mPGES-1 dans les poumons de souris transgéniques n'est pas suffisante en elle-même pour induire la formation de tumeurs [272]. De façon similaire, des niveaux surélevés de mPGES-1 ont été observés dans des cas de cancer du sein [273] et de cancer colorectaux [274]. Ces données suggèrent que la mPGES-1

pourrait être impliquée dans la carcinogénèse et il sera intéressant de vérifier cette hypothèse par l'étude de l'effet d'inhibiteurs de la mPGES-1 sur la progression de certains types de cancers.

#### **2.3.1.1.5. Phénotype des souris déficientes en mPGES-1**

Des souris déficientes en mPGES-1 (mPGES-1<sup>-/-</sup>) ont été générées et ces animaux sont viables et normaux en apparence [48,275]. Par contre, l'étude des souris mPGES-1<sup>-/-</sup> a permis de confirmer le rôle de la mPGES-1 dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> *in vivo* et sa participation aux réactions inflammatoires. En effet, l'augmentation des niveaux sériques de PGE<sub>2</sub> suivant l'injection intrapéritonéale de LPS est abolie dans les souris mPGES-1<sup>-/-</sup>, mais pas la production de TNF- $\alpha$  ou d'IL-6 [48]. De plus, les macrophages de souris mPGES-1<sup>-/-</sup> ne synthétisent pas de PGE<sub>2</sub> en réponse au LPS, contrairement aux macrophages de souris normales [257,259,275,276]. Par contre, les macrophages mPGES-1<sup>-/-</sup> synthétisent une plus grande quantité de TXB<sub>2</sub>, de 6-céto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  et de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  après traitement au LPS, ce qui suggère que la PGH<sub>2</sub> peut être redirigée vers d'autres voies de synthèse de prostanoïdes lorsque l'activité de la mPGES-1 est abolie [257,259,276]. Conformément à ces observations, des niveaux de PGE<sub>2</sub> diminués ont aussi été observés dans plusieurs tissus de souris mPGES-1<sup>-/-</sup> (cerveau, rein, rate et estomac) alors que les niveaux des autres PG et du TX sont élevés dans certains tissus, en particulier dans l'estomac [257]. L'ensemble de ces données démontre que la mPGES-1 est impliquée dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> *in vivo*.

L'implication de la mPGES-1 dans les réponses de fièvre et de douleur a aussi été mise en évidence par la caractérisation des souris mPGES-1<sup>-/-</sup>. L'injection

intrapéritonéale de LPS induit une augmentation des niveaux de PGE<sub>2</sub> dans le liquide céphalorachidien et une réponse de la fièvre chez les souris normales mais pas chez les souris mPGES-1<sup>-/-</sup> [277]. Toutefois, l'injection intracérébro-ventriculaire de PGE<sub>2</sub> dans les souris mPGES-1<sup>-/-</sup> induit une réponse de fièvre comparable aux animaux normaux [277]. Les souris mPGES-1<sup>-/-</sup> sont aussi plus résistantes à la douleur inflammatoire et possiblement à la douleur neuropathique. L'injection intrapéritonéale d'acide acétique induit une réponse de douleur chez la souris, mais cette réponse à la douleur est grandement réduite chez des souris mPGES-1<sup>-/-</sup> et chez des souris normales traitées avec des AINS comparativement aux souris normales contrôles [275,276]. De plus, les souris mPGES-1<sup>-/-</sup> ne développent pas d'allodynie ou d'hyperalgésie suite au sectionnement d'un nerf de la colonne vertébrale, contrairement aux souris normales [278].

Finalement, le rôle de la mPGES-1 dans le développement de l'arthrite a aussi été confirmé par l'étude de souris mPGES-1<sup>-/-</sup>. Les souris mPGES-1<sup>-/-</sup> sont résistantes au développement de l'arthrite induite par l'injection de collagène (collagen-induced arthritis). En effet, dans ce modèle de polyarthrite rhumatoïde, seulement environ 10% des souris mPGES-1<sup>-/-</sup> développent de l'arthrite, comparativement à environ 60% des souris normales [275]. De plus, la sévérité du phénotype arthritique développé par les souris mPGES-1<sup>-/-</sup> est beaucoup moindre que celle des souris contrôles [275]. De façon similaire, les souris mPGES-1<sup>-/-</sup> sont aussi moins sensibles à l'arthrite induite par l'injection d'anticorps anti-collagène (collagen antibody-induced arthritis) mais la fréquence du phénotype arthritique dans ce modèle n'est pas affectée par la délétion de la mPGES-1 [276], contrairement au modèle d'arthrite induite par le collagène.

Néanmoins, les souris mPGES-1<sup>-/-</sup> démontrent une diminution d'environ 50% dans la sévérité de l'arthrite développée suite à l'injection d'anticorps anti-collagène comparativement aux souris contrôles [276]. Ces données suggèrent que la mPGES-1 est impliquée dans le développement de l'arthrite et qu'elle est aussi possiblement importante pour la réponse immunitaire dans le modèle d'arthrite induite par le collagène (reconnaissance de l'antigène et production d'anticorps anti-collagène).

### 2.3.1.2. mPGES-2

Plus récemment, une autre protéine membranaire pouvant catalyser la synthèse de PGE<sub>2</sub> a été identifiée et nommée mPGES-2 [249]. Cette protéine de 290 acides aminés provient d'un gène situé sur le chromosome 9 (9q33-34) chez l'humain [249]. Contrairement à la mPGES-1, la mPGES-2 est abondamment exprimée dans la plupart des tissus et son expression est peu inductible, sauf dans les tissus de cancer colorectaux humains où une induction de la mPGES-2 a été observée [279]. L'activité de synthèse de PGE<sub>2</sub> de la mPGES-2 n'est pas strictement dépendante de la présence de GSH puisque différents composés thiols, incluant le GSH, peuvent stimuler l'activité de la mPGES-2 [249,279,280]. La mPGES-2 possède un K<sub>m</sub> pour le PGH<sub>2</sub> de 28 μM et une activité spécifique de 3.3 μmol/min/mg de protéine [249].

La mPGES-2 a été cristallisée et sa structure a été déterminée par diffraction des rayons X [281]. Cette protéine existe sous forme de dimère et elle est retenue à la membrane par une ancre N-terminale hydrophobe [281]. De plus, les données structurales démontrent que la cystéine 110 est située au site actif de la mPGES-2 et suggèrent que ce résidu pourrait remplacer la fonction du GSH, qui est requise pour



l'activité de toutes les autres PGES. En accord avec cette hypothèse, la mutation de la cystéine 110 de la mPGES-2 en sérine abolit presque complètement l'activité de cette enzyme [280].

Le rôle de la mPGES-2 dans la synthèse de  $PGE_2$  *in vivo* et son implication dans la régulation des différents processus pathophysiologiques restent toutefois à confirmer. De plus, des données récentes suggèrent que la mPGES-2 pourrait lier un complexe d'hème et de GSH, ce qui modifierait son activité enzymatique [282]. En effet, la mPGES-2 complexée à l'hème et au GSH ne forme plus de  $PGE_2$  mais dégrade plutôt la  $PGH_2$  en malondialdéhyde et en 12-HHTrE (acide 12-hydroxyheptadécatriénoïque). L'existence de ce complexe mPGES-2/hème/GSH est cependant controversée [283] et son éventuelle fonction *in vivo* n'est pas connue.

### 2.3.1.3. cPGES

La cPGES (qui est identique à p23, une protéine associée à la chaperonne Hsp90) a été identifiée peu après la mPGES-1 [284] et, tout comme la mPGES-1, l'activité de la cPGES requiert la présence de GSH [284]. L'activité maximale de la cPGES est cependant dépendante de son association avec Hsp90 [285] et de sa phosphorylation par la caséine kinase II [286].

La cPGES est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus et son niveau d'expression est peu affecté par les stimuli pro-inflammatoires, sauf au niveau du cerveau où une induction de la cPGES par le LPS a été observée chez le rat [284]. La cPGES pourrait donc être en partie responsable de la synthèse constitutive de  $PGE_2$ , mais le rôle de cette protéine dans la synthèse de  $PGE_2$  *in vivo* n'est pas encore été bien

caractérisé. En effet, l'étude de souris déficientes en cPGES n'a pas permis de confirmer le rôle de cette protéine dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> [287].

#### **2.3.1.4. Autres protéines pouvant former de la PGE<sub>2</sub>**

Finalement, les glutathion S-transférases (GST) de la classe  $\mu$  ont été identifiées comme des enzymes pouvant catalyser la synthèse de PGE<sub>2</sub>. En effet, les GST- $\mu$ 2 et - $\mu$ 3 recombinantes, mais pas la GST- $\mu$ 4, peuvent catalyser la formation de PGE<sub>2</sub> en présence de GSH ou d'autres composés thiols [288]. Par contre, ces protéines possèdent un K<sub>m</sub> élevé pour le PGH<sub>2</sub> et démontrent une activité spécifique relativement faible [288]. Tout de même, les GST- $\mu$ 2 et - $\mu$ 3 sont abondamment exprimées dans le cerveau [289] et pourraient donc participer à la synthèse de PGE<sub>2</sub> dans ce tissu.

#### **2.3.2. La prostacycline synthase**

L'enzyme qui catalyse le réarrangement de la PGH<sub>2</sub> en PGI<sub>2</sub> est la prostacycline synthase (PGIS). Chez l'humain, la PGIS provient d'un gène situé sur le chromosome 20 (20q13.11-q13.13) [290] qui code pour une hémoprotéine de 500 acides aminés [291]. La PGIS possède des propriétés spectrales communes aux cytochromes P450 (CYP) et fait partie de la famille des CYP (la PGIS est classée comme CYP8A1) [292,293]. Par contre, la PGIS, contrairement aux autres CYP, ne possède pas d'activité enzymatique de mono-oxygénase [294]. La PGIS a récemment été cristallisée et elle possède une structure globale similaire aux structures connues des autres CYP [295].

La PGIS est exprimée dans plusieurs tissus, mais de façon plus abondante dans les vaisseaux sanguins et dans les poumons [291,296]. L'expression de la PGIS dans les cellules endothéliales vasculaires peut être induite par différents stimuli pro-inflammatoires, tels le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6 [291,297].

La synthèse de prostacycline est presque totalement inhibée chez les souris déficientes en PGIS, ce qui confirme l'importance de cette enzyme pour la synthèse de PGI<sub>2</sub> [298]. Des anomalies au niveau rénal ont été observées chez ces animaux PGIS<sup>-/-</sup> en plus d'un épaissement de la paroi des vaisseaux sanguins et d'une élévation de la pression artérielle par rapport aux souris normales [298]. Cependant, une production significativement accrue de thromboxane et de PGE<sub>2</sub> a été observée dans les tissus des souris PGIS<sup>-/-</sup> [298]. Cette augmentation des autres prostanoides, qui est probablement due à la redirection de la PGH<sub>2</sub> produite vers d'autres voies de synthèse terminales, pourrait en partie expliquer le phénotype observé chez les souris PGIS<sup>-/-</sup>, surtout que ces souris démontrent un phénotype différent des souris IP<sup>-/-</sup> [38,298].

### 2.3.3. Les PGD<sub>2</sub> synthèses

Les PGD<sub>2</sub> synthèses (PGDS) catalysent l'isomérisation de l'endoperoxyde de la PGH<sub>2</sub> en 9-hydroxy et 11-céto (voir fig. 2). Deux enzymes distinctes pouvant catalyser cette réaction ont été identifiées: la L-PGDS (PGDS de type lipocaline) et la H-PGDS (PGDS hématopoïétique).

### 2.3.3.1. L-PGDS

La L-PGDS est un membre de la famille des lipocalines, qui sont des protéines impliquées dans la liaison et le transport de molécules hydrophobes ou instables [299]. La L-PGDS est une protéine cytosolique fortement glycosylée d'environ 20 à 30 kDa (dépendamment de l'amplitude de la glycosylation) [300] qui est en fait identique à la protéine  $\beta$ -trace, une protéine majeure du liquide céphalorachidien identifiée en 1961 [300,301]. La L-PGDS est exprimée notamment dans le cerveau et la colonne vertébrale [302]. La L-PGDS est aussi sécrétée dans plusieurs fluides corporels, entre autres dans le liquide céphalorachidien et dans le sang [300], et elle peut lier différents ligands tels les rétinoïdes, la bilirubine et la biliverdine avec grande affinité [303,304].

La présence de composés thiols libres, tels le GSH ou le  $\beta$ -mercaptoéthanol, est essentielle à la synthèse de  $PGD_2$  catalysée par la L-PGDS [305]. Le rôle de la L-PGDS dans la synthèse de  $PGD_2$  *in vivo* a été démontré par l'étude de souris déficientes (L-PGDS<sup>-/-</sup>) et de souris transgéniques surexprimant l'enzyme humaine (L-PGDS-TG). Une capacité de synthèse de  $PGD_2$  diminuée ou augmentée a été observée dans le cerveau des souris L-PGDS<sup>-/-</sup> ou L-PGDS-TG, respectivement [306,307]. La L-PGDS semble donc être une enzyme possédant deux fonctions distinctes, agissant à la fois comme une enzyme pour produire de la  $PGD_2$  lorsqu'elle est à l'intérieur des cellules et comme une protéine de liaison et de transport de molécules lipophiles lorsqu'elle est sécrétée dans l'espace extracellulaire [300].

### 2.3.3.2. H-PGDS

La H-PGDS est une protéine cytosolique de 199 acides aminés qui requiert la présence de GSH pour catalyser la formation de  $\text{PGD}_2$  [308-310]. Cette enzyme fait partie de la famille des GST et elle possède aussi une activité GSH S-transférase [311]. Le patron d'expression de la L-PGDS varie beaucoup d'une espèce à l'autre [312]. En effet, la H-PGDS est principalement exprimée dans les mastocytes de la rate et d'autres tissus tels le thymus et la peau chez le rat [302,309,313], tandis que, chez l'humain, l'expression de la H-PGDS est observée dans la plupart des tissus périphériques [308].

La capacité de synthèse de  $\text{PGD}_2$  de la H-PGDS a été confirmée par l'étude de souris déficientes (H-PGDS<sup>-/-</sup>). Ces souris produisent peu ou pas de  $\text{PGD}_2$  et de  $15\text{-d-PGJ}_2$  et elles démontrent une inflammation plus sévère et prolongée par rapport aux souris normales suite à l'injection d'un antigène dans la patte [314]. Au contraire, des souris transgéniques surexprimant la H-PGDS sont résistantes à l'inflammation dans ce modèle [314]. De plus, dans un modèle d'inflammation systémique chez la souris, l'expression de la H-PGDS est induite 48 h après l'injection intrapéritonéale de LPS, soit beaucoup plus tardivement que COX-2 et mPGES-1 dont l'expression plafonne à 4 h [315]. Ces données suggèrent que la H-PGDS pourrait jouer un rôle dans la résolution de l'inflammation et supportent l'hypothèse que la transition de la production de  $\text{PGE}_2$  vers la production de  $\text{PGD}_2$  est une étape clé de la phase de résolution [316].

### 2.3.4. Les PGF synthases

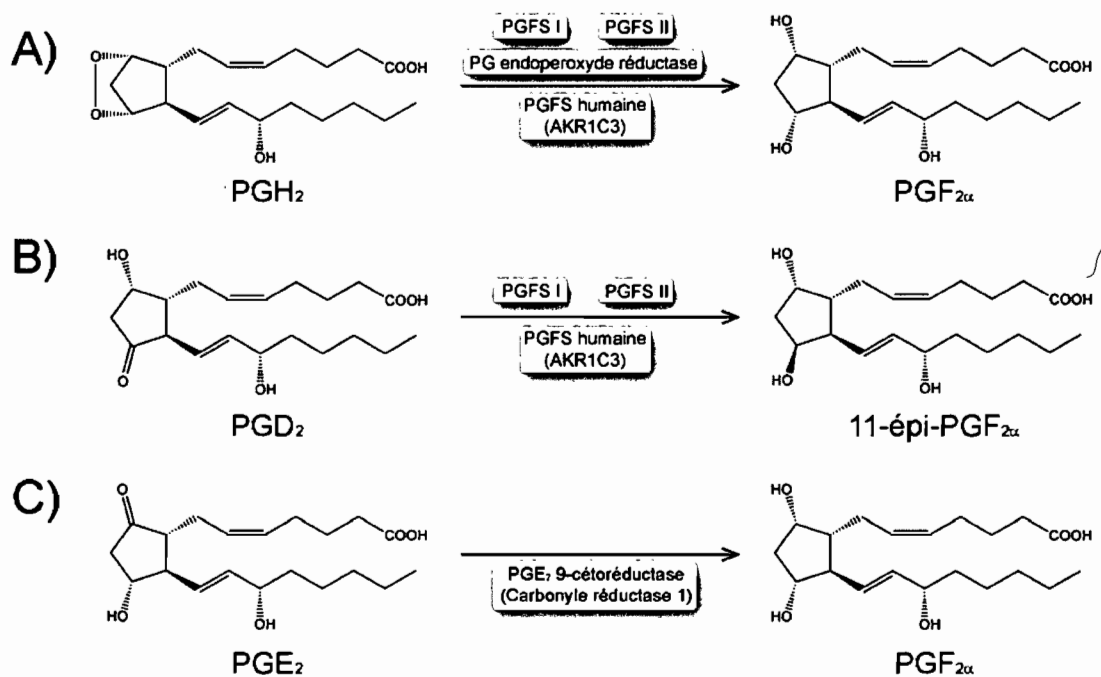
La synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  à partir de la  $\text{PGH}_2$  s'effectue principalement via l'action des PGF synthases (PGFS). Les PGFS sont des protéines cytosoliques d'environ 37 kDa

qui catalysent l'isomérisation de la fonction 9,11-endoperoxyde de la  $\text{PGH}_2$  en fonctions 9-hydroxy et 11-céto. Cependant, les PGF synthases possèdent, en plus de leur activité de  $\text{PGH}_2$  9,11-endoperoxyde réductase, une activité  $\text{PGD}_2$  11-cétoréductase qui catalyse la transformation de la  $\text{PGD}_2$  en  $9\alpha,11\beta$ - $\text{PGF}_2$  (11-épi- $\text{PGF}_{2\alpha}$ , un stéréoisomère de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) [317]. La formation de la 11-épi- $\text{PGF}_{2\alpha}$  a été démontrée *in vivo* et ce stéréoisomère de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimule la contraction des muscles lisses vasculaires et bronchiaux avec une efficacité comparable à celle de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  [318,319].

Il existe d'autres enzymes pouvant catalyser la formation de  $\text{PGF}_2$ , notamment la PG endoperoxyde réductase et la  $\text{PGE}_2$  9-cétoréductase. La PG endoperoxyde réductase catalyse la formation de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  à partir de la  $\text{PGH}_2$ , mais elle est incapable de réduire la fonction 11-céto de la  $\text{PGD}_2$  comme le font les PGFS. La  $\text{PGE}_2$  9-cétoréductase transforme la  $\text{PGE}_2$  en  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . La figure 7 résume les voies de synthèse enzymatiques de la  $\text{PGF}_2$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  et 11-épi- $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) et les enzymes impliquées sont décrites ci-dessous.

#### 2.3.4.1. PGFS

Deux isozymes de PGFS possédant des activités  $\text{PGH}_2$  9,11-endoperoxyde réductase et  $\text{PGD}_2$  11-cétoréductase dépendantes du NADPH ont été identifiées chez le bœuf et nommées PGFS I et PGFS II [317]. La PGFS I, isolée des poumons, est une protéine de 323 acides aminés [320] démontrant des  $K_m$  de 10  $\mu\text{M}$  et 120  $\mu\text{M}$  pour la  $\text{PGH}_2$  et la  $\text{PGD}_2$  respectivement [321]. Cette enzyme peut aussi réduire plusieurs autres molécules carbonylées [321]. Les données suggèrent que la PGFS I comporte



**Figure 7. Voies de synthèse de la prostaglandine  $F_2$ .**

La synthèse de la prostaglandine  $F_2$  (PGF $_{2\alpha}$  et 11-épi-PGF $_{2\alpha}$ ) peut s'effectuer via l'activité de plusieurs enzymes. A) La PGFS I, la PGFS II, la PGFS humaine et la PG endoperoxyde réductase peuvent toutes catalyser la transformation directe de la PGH $_2$  en PGF $_{2\alpha}$ . B) Contrairement à la PG endoperoxyde réductase, les PGFS peuvent aussi utiliser la PGD $_2$  comme substrat et ainsi former la 9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -PGF $_2$  (11-épi-PGF $_{2\alpha}$ ). C) La PGF $_{2\alpha}$  peut aussi être synthétisée à partir de la PGE $_2$  via l'action de la PGE $_2$  9-cétoréductase.

deux sites actifs, un pour l'activité PGH<sub>2</sub> 9,11-endoperoxyde réductase et un autre pour l'activité de réduction des carbonyles, incluant la réduction de la fonction 11-céto de la PGD<sub>2</sub> [321].

De son côté, la PGFS II, isolée du foie, est aussi une protéine de 323 acides aminés qui possède une séquence primaire 87% identique à celle de la PGFS I [322]. La PGFS II possède des K<sub>m</sub> de 25 μM et de 10 μM pour la PGH<sub>2</sub> et la PGD<sub>2</sub> respectivement et, tout comme la PGFS I, elle peut réduire différentes autres molécules carbonylées [323]. Elle semble posséder deux sites actifs distincts, un pour l'activité PGH<sub>2</sub> 9,11-endoperoxyde réductase et l'autre pour l'activité de réduction des groupements carbonyles [323].

Chez l'humain, une PGFS de 323 acides aminés a été clonée à partir d'ADNc de poumon [324]. Cette protéine est membre de la famille des aldo-céto-réductases (AKR), tout comme les PGFS I et II du bœuf, et elle est aussi connue sous le nom d'AKR1C3 [324]. La PGFS humaine est identique à 76% et à 78% aux PGFS I et II du bœuf, respectivement, et elle possède un K<sub>m</sub> de 3.4 μM pour la PGD<sub>2</sub> [324]. L'existence de deux sites actifs distincts a été proposée pour les PGFS I et II du bœuf. Cependant, les données structurales obtenues par diffraction aux rayons X à partir de cristaux de PGFS humaine suggèrent que la PGD<sub>2</sub> et la PGH<sub>2</sub> se lient au même site actif mais avec des orientations opposées et que la catalyse procède via un mécanisme différent pour la réduction de la PGD<sub>2</sub> et de la PGH<sub>2</sub> [325].

Les PGFS I et II du bœuf ainsi que la PGFS humaine peuvent toutes trois catalyser la formation de PGF<sub>2α</sub> à partir de la PGH<sub>2</sub> et de 11-épi-PGF<sub>2α</sub> à partir de la PGD<sub>2</sub>, mais elles sont toutes plus efficaces à transformer la PGD<sub>2</sub> en 11-épi-PGF<sub>2α</sub>



[321,323,324]. De plus, ces trois PGFS ne démontrent pas d'activité PGE<sub>2</sub> 9-cétoréductase significative [321,323,324].

#### **2.3.4.2. PGH<sub>2</sub> 9,11-endoperoxyde réductase**

Une enzyme membranaire monomérique d'environ 16 kDa, nommée PG endoperoxyde réductase, a été isolée de vésicules séminales de mouton [326]. Cette enzyme peut catalyser la formation de PGF<sub>2α</sub> à partir de la PGH<sub>2</sub> en présence de GSH, mais elle n'utilise pas la PGD<sub>2</sub> comme substrat, contrairement aux autres PGFS [326]. Curieusement, l'activité de cette enzyme est stimulée environ 4× lorsqu'elle est chauffée à 100°C pendant 10 min [326].

#### **2.3.4.3. PGE<sub>2</sub> 9-cétoréductase**

La PGF<sub>2α</sub> peut aussi être formée par la réduction de la fonction 9-céto de la PGE<sub>2</sub> en 9-hydroxy. Cette réaction est effectuée par la PGE<sub>2</sub> 9-cétoréductase, qui est aussi connue sous le nom de carbonyle réductase 1 [317]. La PGE<sub>2</sub> 9-cétoréductase convertit la PGE<sub>2</sub> en PGF<sub>2α</sub> de façon dépendante du NADPH ( $K_m$  pour PGE<sub>2</sub> = 160 μM) et peut catalyser la réaction inverse en présence de NADP<sup>+</sup> [327]. Cette enzyme est aussi capable de transformer la PGE<sub>2</sub>, la PGD<sub>2</sub> et la PGF<sub>2α</sub> en métabolites inactifs (15-céto-PGE<sub>2</sub>, 15-céto-PGD<sub>2</sub> ou 15-céto-PGF<sub>2α</sub> respectivement) [327]. Lorsque la PGF<sub>2α</sub> est utilisée comme substrat en présence de NADP<sup>+</sup>, le produit majeur est la 15-céto-PGF<sub>2α</sub> et non la PGE<sub>2</sub>, ce qui suggère que la PGE<sub>2</sub> 9-cétoréductase ne joue pas un rôle significatif dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> [327].

### 2.3.5. La thromboxane synthase

La thromboxane synthase (TXS) catalyse l'isomérisation de la  $\text{PGH}_2$  en  $\text{TXA}_2$  ainsi que le clivage de la  $\text{PGH}_2$  en malondialdéhyde et en 12-HHTrE [328]. Ces produits sont formés par la TXS avec un ratio d'environ 1:1:1 [116,294]. L'importance de la fragmentation de la  $\text{PGH}_2$  en 12-HHTrE catalysée par la TXS n'est pas connue. Par contre, la formation de la  $\text{TXA}_2$  par la TXS joue un rôle clé dans la régulation de plusieurs processus physiologiques, tels la régulation de l'homéostasie vasculaire et de l'agrégation plaquettaire.

Chez l'humain, la TXS provient d'un gène situé sur le chromosome 7 (7q33-q34) [329] qui code pour une hémoprotéine de 533 acides aminés [330]. La TXS est exprimée dans les plaquettes mais aussi dans plusieurs autres tissus, notamment les poumons, le foie, la rate et les reins [329-331].

Tout comme la PGIS, la TXS possède des propriétés spectrales communes aux CYP et fait partie de cette famille (la TXS est classée comme CYP5A1), bien qu'elle ne possède pas d'activité mono-oxygénase [292,293]. Lorsque la TXS lie son substrat, l'atome de fer de l'hème est à proximité de l'oxygène 9 de l'endoperoxyde de la  $\text{PGH}_2$ , contrairement à la PGIS qui lie l'oxygène 11 [294]. Cette différence d'orientation de la  $\text{PGH}_2$  permet d'expliquer les mécanismes réactionnels de la TXS ( $\text{PGH}_2 \rightarrow \text{TXA}_2$  et  $\text{PGH}_2 \rightarrow 12\text{-HHTrE} + \text{malondialdéhyde}$ ) et aussi le fait que la PGIS ne fragmente pas la  $\text{PGH}_2$  en 12-HHTrE [294].

Les souris déficientes en TXS ( $\text{TXS}^{-/-}$ ) sont caractérisées par un temps de saignement prolongé et une agrégation plaquettaire réduite par rapport aux souris normales [332], ce qui est comparable au phénotype des souris déficientes en récepteur

TP [43]. De façon intéressante, les plaquettes des souris  $TXS^{-/-}$  qui ne synthétisent plus de TX produisent une quantité accrue de  $PGE_2$ ,  $PGD_2$  et  $PGF_{2\alpha}$  en réponse à une stimulation avec de l'acide arachidonique, ce qui suggère que la  $PGH_2$  normalement utilisée par la TXS peut être déviée vers d'autres voies métaboliques terminales [332].

### CHAPITRE 3. INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DES PROSTAGLANDINES

L'inhibition de la synthèse des prostanoïdes, et plus spécifiquement l'inhibition de la synthèse de la PGE<sub>2</sub>, est une stratégie thérapeutique très utilisée pour le traitement des maladies inflammatoires. En effet, les COX sont la cible des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), tels l'ibuprofène, le diclofenac, l'acétaminophène et l'acide acétylsalicylique (AAS), et l'efficacité thérapeutique des AINS est attribuée à l'inhibition de la synthèse des prostanoïdes. Les AINS sont parmi les médicaments les plus prescrits et les plus consommés au monde et ils sont principalement utilisés en tant qu'anti-inflammatoires, anti-pyrétiques et analgésiques. Plus récemment, de nouveaux AINS sélectifs pour la COX-2 (coxibs), qui possèdent des propriétés thérapeutiques similaires aux AINS traditionnels mais qui sont mieux tolérés au niveau gastro-intestinal, ont également été mis au point. De plus, des inhibiteurs sélectifs de la mPGES-1 sont présentement en cours d'évaluation et sont considérés comme une option thérapeutique intéressante. Ces trois types d'inhibiteurs de la synthèse des PG sont décrits ci-dessous.

#### **3.1. Les AINS**

Les AINS sont utilisés cliniquement depuis très longtemps (l'AAS, ou Aspirine<sup>®</sup>, est commercialisée depuis 1899 par Bayer [184]), mais ce n'est qu'en 1971 que leur mécanisme d'action a été démontré comme étant l'inhibition de la synthèse des prostaglandines [333]. Les AINS ciblent les COX (COX-1 et COX-2) et inhibent leur

activité cyclo-oxygénase (acide arachidonique  $\rightarrow$  PGG<sub>2</sub>), mais ils n'affectent pas directement leur fonction peroxydase (PGG<sub>2</sub>  $\rightarrow$  PGH<sub>2</sub>) [193]. Les AINS sont divisés en deux classes, soit les AINS traditionnels qui inhibent COX-1 et COX-2, et les coxibs qui montrent une sélectivité pour la COX-2. Les différents AINS inhibent les COX par trois mécanismes différents: 1) inhibition irréversible par modification covalente (ex: AAS), 2) inhibition réversible compétitive (ex: ibuprofen) et 3) inhibition dépendante du temps et lentement réversible (ex: indométhacine et coxibs) [184].

### 3.1.1. Acétylation des COX par l'acide acétylsalicylique

L'AAS est le seul AINS commercialisé qui inhibe l'activité des COX avec un mécanisme impliquant une modification covalente irréversible. En effet, l'AAS acétyle la sérine 530 de la COX-1 (Ser516 pour COX-2) résultant en l'inhibition de l'activité cyclo-oxygénase [334,335]. La sérine acétylée par l'AAS n'est pas un résidu impliquée dans la catalyse. Un mutant de COX-1 où la Ser530 a été remplacée par une alanine possède un  $K_m$  inchangé pour l'acide arachidonique mais résiste à l'acétylation par l'AAS [336]. Par contre, la sérine modifiée par l'AAS est située au niveau du tunnel menant au site cyclo-oxygénase des COX et son acétylation a pour effet d'empêcher l'acide arachidonique de se positionner correctement au site actif pour être converti en PGG<sub>2</sub>. L'AAS est plus efficace à acétyler COX-1 que COX-2 [337]. De plus, l'acétylation par l'AAS inhibe complètement la synthèse de PGG<sub>2</sub> par COX-1 et COX-2, mais le site actif plus spacieux de la COX-2 permet à l'enzyme acétylée d'être toujours catalytiquement active. En effet, l'acétylation de la COX-2, tout en inhibant la formation de PGG<sub>2</sub>, stimule la formation de 15-(R)-HPETE (acide 15-

hydroperoxyeicosatétraénoïque) qui est converti en 15-(R)-HETE [335,338]. La pertinence de ce changement d'activité catalytique de la COX-2 par l'AAS *in vivo* n'est pas bien définie, mais il a été proposé que le 15-(R)-HETE ainsi produit puisse servir à la synthèse de lipoxines anti-inflammatoires (15-épi-lipoxine) [135].

### **3.1.2. Inhibition compétitive ou dépendante du temps**

Tous les AINS, sauf l'AAS, inhibent l'activité des COX de façon compétitive et rapidement réversible ou de façon dépendante du temps. L'inhibition compétitive des COX par les AINS (ex: l'ibuprofen) se caractérise par un mécanisme à une seule étape, soit la liaison réversible de l'inhibiteur au site actif de l'enzyme [184]. Par contre, l'inhibition dépendante du temps par d'autres AINS (ex: indométhacine, flurbiprofen ou diclofenac) est caractérisée par un mécanisme comprenant au moins deux étapes [184]. La première étape est la liaison rapide et réversible de l'inhibiteur à l'enzyme, tout comme pour les inhibiteurs compétitifs. Cette première étape est suivie d'une seconde étape beaucoup plus lente qui consiste en la formation d'un complexe enzyme-inhibiteur plus stable et pratiquement irréversible (vitesse de dissociation du nouveau complexe  $\ll$  vitesse de formation).

### **3.1.3. Efficacité thérapeutique des AINS traditionnels**

Les AINS traditionnels sont largement utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétiques et analgésiques, et l'efficacité thérapeutique de cette classe de composés pour le traitement des symptômes de l'arthrite a depuis longtemps été démontrée [339]. Similairement, l'administration des ces composés montre de

l'efficacité dans différents modèles animaux d'inflammation [340-343], de douleur [340-343] et de fièvre [341-345].

Cependant, certains AINS sont utilisés cliniquement à d'autres fins. Par exemple, l'AAS est utilisée de façon préventive chez les patients qui sont à risque de subir des complications cardiovasculaires, telles de l'angine aiguë, un infarctus du myocarde ou un accident cérébrovasculaire [346]. Les propriétés uniques de l'AAS (inhibition irréversible de COX-1) en font l'AINS principal démontrant un bénéfice au niveau cardiovasculaire. En effet, de faibles doses quotidiennes d'AAS sont suffisantes pour inhiber la synthèse plaquettaire de TXA<sub>2</sub> sans affecter la production urinaire des autres prostaglandines [347]. Cette sélectivité des faibles doses d'AAS pour l'inhibition de la COX-1 plaquettaire par rapport aux autres tissus peut s'expliquer par le fait que l'AAS inhibe la COX-1 des plaquettes dans la circulation présystémique (circulation porte) [348], échappant ainsi à la dégradation initiale par le foie. De plus, à cause de l'inhibition irréversible des COX, une cellule qui a été traitée à l'AAS doit nécessairement synthétiser de nouvelles COX pour remplacer celles qui ont été acétylées et ainsi récupérer sa capacité de synthèse de prostanoides. Puisque les plaquettes sont dépourvues de noyaux et qu'elles sont incapables de synthétiser de nouvelles COX, l'inhibition des COX dans ce type cellulaire par l'AAS est efficace pour toute la durée de vie des plaquettes, soit d'environ de 7 à 10 jours [347,349]. En conséquence, l'administration chronique d'AAS à des doses quotidiennes aussi faibles que 75 mg par jour chez l'homme est suffisante pour inhiber complètement la synthèse de TXA<sub>2</sub> par les plaquettes et prévenir les accidents cardiovasculaires [185].

Finalement, des études cliniques ont démontré que les AINS peuvent contrer la progression de certains types de cancers [350]. En effet, l'administration de piroxicam ou de sunlidac prévient le développement ou la progression des tumeurs intestinales induites par un agent cancérigène chez le rat [351,352]. De plus, l'efficacité de l'AAS et d'autres AINS pour prévenir les cancer colorectaux a été démontrée chez l'humain [350,353]. Des études ont aussi suggéré que l'utilisation d'AINS pourrait prévenir le développement d'autres types de cancer, comme le cancer du sein [354].

#### **3.1.4. Effets secondaires des AINS traditionnels**

L'utilisation d'AINS traditionnels peut entraîner plusieurs effets secondaires indésirables, principalement au niveau gastro-intestinal et rénal. Les effets néfastes au niveau gastro-intestinal sont les principaux effets secondaires associés à l'utilisation chronique d'AINS traditionnels [355]. L'administration chronique d'AINS traditionnels peut entraîner de l'inconfort abdominal et de la dyspepsie en plus d'être parfois associée à des complications plus graves, telles que des érosions ou des ulcères ainsi qu'au développement de perforations de la muqueuse gastro-intestinale pouvant causer des saignements sévères et occasionnellement mortels [356]. L'incidence estimée des complications gastro-intestinales graves chez les patients utilisant des AINS traditionnels de façon chronique varie entre 0.2 et 1.5% [355-357]. Les effets gastro-intestinaux des AINS traditionnels sont reliés à l'inhibition de COX-1 dans la muqueuse gastro-intestinale, ce qui diminue la production des prostaglandines gastro-protectrices [52-54,356].



En plus des effets au niveau gastro-intestinal, les AINS traditionnels peuvent aussi causer des effets secondaires au niveau rénal, surtout chez les patients plus à risque tels que les personnes âgées ou les personnes ayant une fonction rénale réduite. Les AINS peuvent entraîner une rétention d'eau et de sel en plus d'une diminution de la filtration glomérulaire, ce qui peut augmenter la pression sanguine ou aggraver une hypertension préexistante [358]. Plus rarement, l'utilisation d'AINS peut aussi causer une insuffisance rénale aiguë [359].

### **3.2. Les coxibs**

La découverte de COX-2 ainsi que son implication dans les processus inflammatoires a rapidement entraîné le développement d'inhibiteurs sélectifs contre cette isozyme dans l'espoir d'obtenir des inhibiteurs libres des effets secondaires néfastes des AINS non sélectifs, mais tout aussi efficaces en tant qu'anti-inflammatoires et analgésiques. Le développement de ces coxibs a été rapide et deux nouveaux produits ont été introduits sur le marché en 1999: le rofécoxib (Vioxx<sup>®</sup>, Merck) et le célécoxib (Célébrex<sup>®</sup>, Pfizer).

#### **3.2.1. Efficacité thérapeutique des coxibs**

Conformément aux espérances à l'origine de leur développement, les coxibs sont aussi efficaces que les AINS traditionnels en tant qu'analgésiques, anti-pyrétiques et anti-inflammatoires [360]. Leur efficacité thérapeutique a été démontrée dans plusieurs modèles animaux, tels que des modèles de fièvre [341-344], des modèles de douleur inflammatoire [340,342,343] ainsi que dans des modèles d'arthrite [340-342]. De plus,

les coxibs ont aussi une efficacité comparable aux AINS traditionnels pour le traitement de la douleur chez l'humain [361-363]. Cependant, ces composés sont beaucoup mieux tolérés au niveau gastro-intestinal, tant chez les animaux [343,364] que chez l'humain [365,366]. Par contre, une induction de la COX-2 a été observée dans les lésions gastro-intestinales chez la souris [204], chez le rat [203], ainsi que chez l'humain [367] et les coxibs peuvent ralentir la guérison des lésions gastiques [203,204].

Les coxibs, tout comme les AINS non sélectifs, sont aussi en mesure de contrer le développement de certains types de cancers, notamment les cancers colorectaux [226,350]. La COX-2 est surexprimée dans plusieurs tumeurs cancéreuses et les coxibs sont efficaces pour diminuer l'incidence ou la progression des cancers, ce qui suggère que les propriétés anti-cancéreuses des AINS non sélectifs soient principalement reliées à l'inhibition de la COX-2, bien qu'un rôle indépendant de la COX-1 a aussi été décrit [350].

### **3.2.2. Effets secondaires des coxibs**

Bien que les coxibs soient beaucoup mieux tolérés au niveau gastro-intestinal que les AINS traditionnels, ces nouveaux inhibiteurs sont aussi associés à des effets secondaires au niveau rénal qui sont comparables à ceux des AINS traditionnels [359]. Il s'avère donc que la toxicité rénale des AINS traditionnels est, au moins partiellement, due à l'inhibition de la COX-2 au niveau rénal.

De plus, l'utilisation chronique de coxibs pendant des périodes prolongées a récemment été associée à une augmentation du risque de subir des événements cardiovasculaires tels que des infarctus du myocarde et des accidents cérébrovasculaires

[368,369]. Ces nouvelles données ont mené au retrait volontaire du rofécoxib du marché mondial en septembre 2004 ainsi qu'à la réévaluation des autres coxibs et AINS disponibles sur le marché par la FDA (Food and Drug Administration) aux États-Unis et par d'autres agences de régulation. La FDA a statué que l'augmentation des risques cardiovasculaires associée aux coxibs devait aussi être étendue à tous les AINS (coxibs et AINS traditionnels) et a imposé une révision des monographies de tous les AINS. Présentement, le célécoxib est le seul coxib toujours disponible au Canada et aux États-Unis.

Les mécanismes expliquant les effets cardiovasculaires des coxibs ne sont pas connus. Il a été suggéré que l'augmentation du risque de subir des événements cardiovasculaires graves suivant l'administration chronique de coxibs pourrait être due à une inhibition de la synthèse de prostacycline dans l'endothélium vasculaire [370]. En effet, des études chez l'humain ont démontré que l'administration de coxibs entraînait une inhibition de l'excrétion urinaire des métabolites de la prostacycline mais qu'elle n'affectait pas l'excrétion des métabolites de la thromboxane [236,371,372]. Cependant, la mesure des métabolites urinaires de la prostacycline et de la thromboxane est uniquement représentative de la synthèse systémique de ces deux prostanoides, si bien que le ou les tissus responsables de la synthèse de ces composés ne peuvent pas être identifiés de façon exacte [373]. Néanmoins, puisque les vaisseaux sanguins sont une riche source de prostacycline et que la COX-2 est induite *in vitro* par la force de cisaillement associée à un flux laminaire dans les cellules endothéliales [374], il a rapidement été conclu que les métabolites urinaires de la prostacycline, et plus précisément la 2,3-dinor-6-céto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , était un marqueur de la synthèse vasculaire de

prostacycline [236]. En considérant cette hypothèse, l'administration chronique de coxibs entraînerait une condition pro-thrombotique en inhibant la synthèse de prostacycline, une prostaglandine vasodilatatrice et anti-plaquettaire, et la persistance de cette condition pro-thrombotique expliquerait les effets cardiovasculaires observés chez certains patients.

Cependant, cette hypothèse est de plus en plus controversée et il existe plusieurs données contradictoires [375,376]. Par exemple, il n'y a aucune évidence claire démontrant une expression constitutive de COX-2 dans l'endothélium normal ou un rôle de cette enzyme dans la synthèse vasculaire de prostacycline [375-379], ce qui remet en question l'interprétation des données sur l'inhibition de l'excrétion urinaire des métabolites de prostacycline. De plus, l'analyse rétrospective de données cliniques suggère que les AINS traditionnels sont aussi associés à des risques cardiovasculaires plus élevés [380], ce qui est difficilement compatible avec l'hypothèse du déséquilibre du ratio prostacycline/thromboxane dans le système vasculaire. Enfin, il a été suggéré que les effets secondaires cardiovasculaires des coxibs et des AINS pourraient être dus à une inhibition plus importante de la COX-1 des cellules endothéliales par rapport aux plaquettes par ces composés [381].

En somme, les données cliniques montrent que les coxibs sont associés à long terme à une augmentation d'effets secondaires sur le système cardiovasculaires, mais le ou les mécanismes responsables de cette augmentation ne sont pas bien connus. De plus, il semble que la plupart des AINS traditionnels sont aussi associés à une augmentation des risques cardiovasculaires.

### 3.3. Les inhibiteurs de la mPGES-1

Dans l'espoir de trouver de nouvelles façon d'inhiber la synthèse de PGE<sub>2</sub> et d'augmenter l'index thérapeutique des anti-inflammatoires, une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant la mPGES-1 est présentement à l'étude. En effet, l'inhibition sélective de la synthèse de PGE<sub>2</sub> par la mPGES-1 est potentiellement plus spécifique et ne devrait pas inhiber la synthèse de prostacycline. De plus, la mPGES-1 est, tout comme COX-2, une enzyme inductible impliquée dans les réactions inflammatoires. Les souris déficientes en mPGES-1 ont un phénotype normal, mais elles sont résistantes à l'inflammation et à la douleur dans divers modèles [48,275,276]. La mPGES-1 représente donc une nouvelle cible thérapeutique très intéressante. Jusqu'à présent, seulement quelques inhibiteurs de la mPGES-1 développés par Merck Frosst [382,383] et par Biolipox [384] ont été décrits. Les meilleurs inhibiteurs sont très puissants (IC<sub>50</sub> = 1 nM), sélectifs et ils démontrent une efficacité comparable aux AINS et aux coxibs pour le traitement de la douleur et de la fièvre dans les modèles animaux [385]. Cependant, les effets potentiels des inhibiteurs sélectifs de la mPGES-1 sur le système cardiovasculaires restent à déterminer. En effet, un groupe a rapporté que la pression sanguine des souris mPGES-1<sup>-/-</sup> sur une diète riche en NaCl n'est pas significativement différente de celles des animaux normaux [386], tandis qu'un autre groupe a rapporté qu'elles développent une hypertension plus sévère que les animaux normaux [387].

## **CHAPITRE 4. LES RELATIONS ENTRE LES ENZYMES DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DES PROSTANOÏDES**

La synthèse des différentes prostanoïdes nécessite en tout trois étapes: la libération de l'acide arachidonique, la transformation de l'acide arachidonique en PGH<sub>2</sub> via les cyclo-oxygénases et la synthèse des différentes prostanoïdes à partir de la PGH<sub>2</sub> via les prostanoïdes synthases terminales. Généralement, la capacité de synthèse des prostanoïdes par une cellule quelconque dépend des niveaux d'expression et d'activation des différentes enzymes impliquées dans cette cascade. Cependant, des données récentes suggèrent qu'il pourrait exister un couplage préférentiel entre certaines des enzymes de la voie de synthèse des prostanoïdes. Un tel couplage pourrait permettre à une cellule de synthétiser majoritairement une prostanoïde particulière en présence de plusieurs synthases terminales dans certaines conditions. Bien que la COX-2 puisse utiliser de faibles concentrations d'acide arachidonique plus efficacement que la COX-1, il a été démontré que la cPLA<sub>2</sub> est en mesure de fournir l'acide arachidonique aux deux COX avec une efficacité comparable [388]. Cependant, différents couplages préférentiels ont été suggérés entre les COX et les différentes prostanoïdes synthases terminales et ces couplages proposés sont discutés ci-dessous.

### **4.1. COX / PGES**

Il a été proposé que les trois PGES principales sont couplées avec les COX de façon différente. Cette proposition est fondée sur des résultats obtenus en stimulant des cellules HEK293 (human embryonic kidney cells) avec de l'IL-1, du Ca<sup>2+</sup>-ionophore ou

de l'acide arachidonique exogène suivant la co-transfection des différentes PGES avec COX-1 ou COX-2. Par cette approche, il a été observé que la mPGES-1 produit plus de PGE<sub>2</sub> en réponse aux différents stimuli lorsqu'elle est co-transfectée avec COX-2 que lorsqu'elle est co-transfectée avec COX-1 [252]. À l'opposé, la cPGES-1 ne produit de la PGE<sub>2</sub> que lorsqu'elle est exprimée avec COX-1 [284]. Il a donc été conclu que la mPGES-1 se couple préférentiellement avec COX-2 pour la synthèse de PGE<sub>2</sub> et que la cPGES est couplée de façon stricte avec COX-1. La mPGES-2, contrairement aux deux autres PGES, utilise apparemment la PGH<sub>2</sub> formée par une ou l'autre des cyclo-oxygénases avec une efficacité comparable [279].

La coordination entre COX-2 et mPGES-1 est particulièrement importante en situation pro-inflammatoire. En effet, lors des réactions inflammatoires, la COX-2 et la mPGES-1 sont toutes deux induites et responsables de la synthèse accrue de PGE<sub>2</sub> observée dans ces conditions. La co-induction de COX-2 et de mPGES-1 a été démontrée dans plusieurs modèles d'inflammation *in vitro* et *in vivo* [46,47,261,262], bien que le niveau d'expression maximal de la COX-2 précède souvent celui de la mPGES-1 [47,261,263]. Néanmoins, une co-induction de la COX-2 et de la mPGES-1, plutôt qu'un couplage fonctionnel entre ces protéines, pourrait expliquer le fait que les deux enzymes agissent de concert.

Bien que COX-2 et de la mPGES-1 jouent un rôle coordonné dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> dans plusieurs modèles, certaines données contestent la proposition d'un couplage préférentiel entre ces enzymes. Notamment, une récente étude faisant usage d'inhibiteurs sélectifs et de la technologie d'ARN interférence conclut que la mPGES-1 peut utiliser comme substrat la PGH<sub>2</sub> formée par l'une ou l'autre des COX [389]. De

plus, l'analyse de la production de PGE<sub>2</sub> par des macrophages résidents du foie stimulés avec du LPS suggère que la mPGES-1 se couple aussi avec COX-1 [390]. Finalement, la synthèse gastrique de PGE<sub>2</sub>, qui dépend de COX-1, est significativement diminuée dans les souris mPGES-1<sup>-/-</sup> [257]. L'ensemble des données suggèrent donc que la mPGES-1 peut se procurer son substrat aussi bien de COX-1 que de COX-2.

#### 4.2. COX-2 / PGIS

Il a été proposé que la prostacycline synthase, tout comme mPGES-1, est préférentiellement couplée à COX-2 car la production de PGI<sub>2</sub> est plus grande suite à la co-transfection de la PGIS avec COX-2 qu'avec COX-1 dans des cellules HEK293 [391]. De plus, l'augmentation de la production de PGI<sub>2</sub> et de PGE<sub>2</sub> par les macrophages traités au LPS a été rapportée comme dépendante de COX-2 [392]. Un couplage entre l'activité de COX-2 et la synthèse de PGI<sub>2</sub> dans des cellules endothéliales humaines traitées à l'IL-1 $\beta$  a aussi été proposé, bien que ce couplage puisse s'expliquer par une simple co-induction de la COX-2 et de la PGIS [393]. Une dépendance de la PGIS pour COX-2 a aussi été proposé pour l'endothélium vasculaire puisque l'administration d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 chez l'humain entraîne une inhibition significative de l'excrétion urinaire des métabolites de la prostacycline [236,371,372].

Malgré ces données qui suggèrent que la PGIS fonctionne préférentiellement avec COX-2, il est bien établi que la PGIS peut aussi convertir la PGH<sub>2</sub> produite par COX-1. En effet, la surexpression conjointe de la PGIS avec la COX-1 dans des cellules endothéliales par infection avec des adénovirus recombinants cause une forte stimulation de la synthèse de prostacycline [394,395]. De la même manière, le transfert



simultané des gènes de la COX-1 et de la PGIS par injection intracérébroventriculaire d'adénovirus recombinants cause une augmentation de la production de PGI<sub>2</sub> dans le cerveau de rats et diminue de façon significative le volume d'infarctus cérébral dans un modèle d'ischémie-reperfusion [396]. Donc, la prostacycline synthase peut utiliser la PGH<sub>2</sub> synthétisée par l'une ou l'autre des cyclo-oxygénases pour catalyser la formation de PGI<sub>2</sub> dépendamment des modèles utilisés.

#### 4.4. COX et autres synthèses terminales

Le couplage d'autres prostanoides synthèses terminales avec la COX-1 et la COX-2 a aussi été caractérisé par co-transfection dans des cellules HEK293 [391]. Les résultats démontrent que la TXS, la PGIS et la mPGES-1 ont toutes un comportement similaire, c'est-à-dire un apparent couplage préférentiel avec la COX-2 par rapport à la COX-1. Par contre, elles sont aussi toutes en mesure d'utiliser la PGH<sub>2</sub> formée par la COX-1 lorsque l'apport en acide arachidonique est élevé [391]. Pour sa part, la H-PGDS a un comportement différent des autres prostanoides synthèses dans ce modèle cellulaire. La H-PGDS utilise préférentiellement la COX-1 pour la synthèse de PGD<sub>2</sub> suivant une stimulation avec un ionophore du Ca<sup>2+</sup> mais d'avantage la COX-2 lorsque les cellules sont stimulées avec de l'IL-1β. Le couplage de la H-PGDS avec les COX semble être en partie relié à la localisation cellulaire de cette prostaglandine synthase. En effet, en absence de stimuli, la H-PGDS est localisée majoritairement dans le cytosol et, suivant la stimulation des cellules par l'IL-1β, elle se relocalise dans la région périnucléaire [391].

En somme, les différentes prostanoïdes synthases peuvent généralement utiliser la  $\text{PGH}_2$  formée par l'une ou l'autre des cyclo-oxygénases, mais avec des efficacités différentes selon les conditions. Le phénomène de couplage entre les COX et les synthases terminales n'est pas très bien caractérisé, mais il pourrait dépendre de plusieurs facteurs, notamment de la co-expression ou de la co-induction des différentes enzymes, de leur localisation cellulaire, de la quantité d'acide arachidonique libérée, des paramètres cinétiques des différentes synthases terminales ou même d'une interaction physique entre deux enzymes particulières.

**DEUXIÈME PARTIE:**

**RÉSULTATS**

## **CHAPITRE 5. HYPOTHÈSES, OBJECTIFS ET RÉSUMÉ DES RÉSULTATS**

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse porte sur la caractérisation de deux aspects de la voie de synthèse des prostanoïdes, soient les relations entre la COX-2 et les prostanoïdes synthases terminales et le rôle des enzymes COX-2 et mPGES-1 dans la synthèse basale de prostaglandines en absence d'inflammation. Bien que l'expression constitutive de COX-2 dans certains tissus ait été détectée il y a plus d'une décennie, le rôle de la COX-2, ou de la mPGES-1, dans la synthèse basale des prostanoïdes en absence d'inflammation n'a que très peu été caractérisé. De plus, il a été suggéré que la COX-2 puisse être préférentiellement associée à certaines prostanoïde synthases, notamment la mPGES-1 et la PGIS, presque exclusivement à partir de données obtenues de systèmes cellulaires d'induction *in vitro*. À la base, notre hypothèse était que la COX-2 et la mPGES-1 pourraient probablement contribuer à la synthèse basale des prostanoïdes dans les tissus où elles sont suffisamment exprimée de façon constitutive et que le couplage apparent entre la COX-2 et la PGIS ou la mPGES-1 dépendait d'avantage d'une co-expression spatio-temporelle de ces enzymes plutôt que d'une interaction préférentielle entre elles. Nos études avaient donc comme objectifs de définir la contribution de la COX-2 à la synthèse basale des prostanoïdes dans différents tissus, d'identifier la nature des prostanoïdes produites par la COX-2, ainsi que de caractériser les relations entre la COX-2 et la PGIS ou la mPGES-1. Pour ce faire, nous avons utilisé différentes approches pharmacologiques et biochimiques.

Dans le premier article, au chapitre 6, nous avons utilisé une nouvelle approche de pontage avec un analogue photo-activable de la méthionine pour caractériser les

structures oligomériques de la COX-2 et de la mPGES-1 ainsi que pour détecter une interaction potentielle entre les chaînes peptidiques de ces deux enzymes. Nos résultats démontrent que COX-2 existe sous forme de dimère et que la mPGES-1 peut former un oligomère dans des cellules intactes. De plus, nous n'avons trouvé aucune évidence d'une interaction directe entre la mPGES-1 et la COX-2. Nos données suggèrent que la synthèse de PGE<sub>2</sub> par ces deux enzymes n'est pas dépendante d'une interaction directe entre les deux protéines ou qu'une telle interaction implique des régions non accessibles aux agents de pontage utilisés dans nos expériences.

Dans le second article, au chapitre 7, nous avons examiné le rôle proposé pour la COX-2 dans la synthèse de prostacycline dans l'endothélium vasculaire. Nous avons déterminé la co-localisation de la COX-2 et de la PGIS dans l'endothélium de chien. Nos données indiquent que la PGIS est principalement co-localisée avec la COX-1. De plus, la COX-2 n'est que faiblement exprimée dans l'endothélium vasculaire normal et ne montre pas de co-localisation préférentielle avec la PGIS. Ces résultats sont en accord avec nos données pharmacologiques qui montrent que l'inhibition de COX-2 avec un inhibiteur sélectif ne diminue pas significativement les niveaux de 6-céto-PGF<sub>1α</sub> (le métabolite de la prostacycline) dans l'aorte. L'ensemble de ces résultats suggère que la COX-1 est principalement responsable de la synthèse de prostacycline dans l'endothélium vasculaire normal tandis que la COX-2 n'y joue pas un rôle quantitativement important.

Dans le but de mieux définir l'implication de la COX-2 dans la synthèse des prostanoides, nous avons quantifié les niveaux des PG et du TXB<sub>2</sub> dans divers tissus suivant l'administration d'inhibiteurs sélectifs de COX-1 ou de COX-2. Ces résultats

sont présentés dans le troisième article, au chapitre 8, et ils démontrent que la COX-2 est impliquée dans la synthèse basale des prostanoïdes dans les reins et le cerveau en absence de traitement pro-inflammatoire. Nos données montrent que l'inhibition sélective de la COX-2 dans ces tissus entraîne une réduction des niveaux de toutes les prostanoïdes mesurées, ce qui suggèrent que la COX-2 n'est pas couplée de façon préférentielle à une prostanoïde synthase particulière. De plus, en accord avec les résultats du chapitre 7, nos résultats démontrent que la synthèse des prostanoïdes dans l'aorte est dépendante de COX-1, et non pas de COX-2.

Finalement, dans le quatrième article, au chapitre 9, nous avons déterminé la distribution tissulaire de mPGES-1 chez la souris dans le but de mieux caractériser son implication dans la synthèse basale de PGE<sub>2</sub>. Nos résultats révèlent une plus forte expression constitutive de la mPGES-1 dans le tissu adipeux blanc de souris que dans tous les autres tissus étudiés. Paradoxalement, l'expression de la mPGES-1 et les niveaux de PGE<sub>2</sub> sont diminués dans le tissu adipeux de souris obèses, une condition qui est maintenant reconnue comme étant associée à une faible inflammation chronique. Ces résultats suggèrent que la mPGES-1 est impliquée dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> dans le tissu adipeux et qu'elle est sujette à une régulation par la diète. La modulation du niveau d'expression de la mPGES-1 pourrait potentiellement contribuer aux variations de la régulation de la lipolyse et de l'adipogénèse dans le tissu adipeux observés durant l'obésité.

En conclusion, nos données montrent que la COX-2 est constitutivement active et impliquée dans la synthèse de chacun des types de prostanoïdes en absence

d'inflammation dans certains tissus. Cependant, nous démontrons que la PGIS est préférentiellement associée à la COX-1, et non pas à la COX-2, pour la synthèse de prostacycline dans l'endothélium, ce qui est accord avec une récente réévaluation du rôle des COX dans la synthèse vasculaire de prostanoïdes [376,381]. De plus, nos données indiquent que la mPGES-1 est abondamment exprimée dans le tissu adipeux et que ses niveaux sont diminués par une diète riche en gras, suggérant un nouveau rôle pour cette enzyme dans les changements associés à l'obésité.

## CHAPITRE 6.

### **Photo-crosslinking of proteins in intact cells reveals a dimeric structure of cyclooxygenase-2 and an inhibitor-sensitive oligomeric structure of microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1**

Héту, P.O., Ouellet, M., Falguyret, J.P., Ramachandran, C., Robichaud, J., Zamboni, R. et Riendeau, D. (2008) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, sous presse.

#### Contribution des auteurs:

Pierre-Olivier Héту: Expérimentation, analyse des résultats et rédaction du manuscrit.

Marc Ouellet: Purification de la mPGES-1 humaine et caractérisation de l'anticorps monoclonal généré à partir de la protéine purifiée.

Jean-Pierre Falguyret: Travail exploratoire sur le photo-marquage cellulaire .

Chidambaram Ramachandran: Travail exploratoire sur le photo-marquage cellulaire.

Joel Robichaud: Isolation de la L-photo-Met à partir d'un mélange racémique de D,L-photo-Met.

Robert Zamboni: Synthèse de la photo-Met.

Denis Riendeau: Supervision générale du projet et rédaction du manuscrit.



**Photo-crosslinking of proteins in intact cells reveals a dimeric structure of cyclooxygenase-2 and an inhibitor-sensitive oligomeric structure of microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1**

Pierre-Olivier Héту<sup>1,4</sup>, Marc Ouellet<sup>1</sup>, Jean-Pierre Falguyret<sup>1</sup>, Chidambaram Ramachandran<sup>1,5</sup>, Joel Robichaud<sup>2</sup>, Robert Zamboni<sup>2</sup>, and Denis Riendeau<sup>3,4</sup>.

From the Departments of <sup>1</sup>Biochemistry & Molecular Biology, <sup>2</sup>Medicinal Chemistry, and <sup>3</sup>Pharmacology, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Kirkland, QC, Canada, and the <sup>4</sup>Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

<sup>5</sup>Present address: Department of Inflammation, Amgen, Seattle, WA.

**Running title:** Oligomeric structure of mPGES-1 in intact cells

**Corresponding author:** Dr. Denis Riendeau, Department of Pharmacology, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, 16711 Trans-Canada Hwy, Kirkland, QC, Canada, H9H 3L1. Phone: 1-514-428-2673, Fax: 1-514-428-8697. E-mail:

████████████████████

**Abbreviations used:** PG, prostaglandin; COX, cyclooxygenase; mPGES, microsomal PGE<sub>2</sub> synthase; cPGES, cytosolic PGE<sub>2</sub> synthase; Photo-Met, L-2-amino-5,5'-azihexanoic acid; FBS, fetal bovine serum; DPBS, Dulbecco's phosphate buffered saline; DMEM, Dulbecco's modified Eagle media; DSS, disuccinimidyl suberate; DFDNB, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene; DFU, 5,5-dimethyl-3-(3-fluorophenyl)-4-(4-methylsulphonyl) phenyl-2(5*H*)-furanone; MF63, 2-(6-chloro-1*H*-phenanthro[9,10-*d*]imidazol-2-yl)isophthalonitrile; MAPEG, membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism.

**Abstract**

We have characterized the structures of cyclooxygenase-2 (COX-2) and microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 (mPGES-1) in intact cells using bifunctional and photo-activatable crosslinking agents. A dimeric complex was detected for COX-2 by both crosslinking approaches, consistent with the crystal structure of the enzyme. For mPGES-1, treatment of A549 cells with disuccinimidyl suberate yielded immunoreactive protein bands corresponding to a dimer (33 kDa) and a trimer (45 kDa), as observed for the isolated enzyme. Photo-crosslinking with photo-methionine in intact cells generated complexes with molecular weights corresponding to the dimer (33 kDa) and two putative trimer forms (50 and 55 kDa). Treatment with the selective mPGES-1 inhibitor MF63 prevented the formation of the 50 and 55 kDa crosslinked complexes, while an inactive structural analogue had no effect. Our data indicate that COX-2 forms a dimer in intact cells and that mPGES-1 has an oligomeric structure that can be disrupted by a selective inhibitor.

**Keywords:** microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 (mPGES-1); cyclooxygenase-2 (COX-2); prostaglandins; protein photo-crosslinking; photo-methionine; selective mPGES-1 inhibitor.

## Introduction

Prostaglandins (PGs) are lipid mediators implicated in many pathophysiological processes, including pain, fever, inflammation, and regulation of gastric, renal and cardiovascular homeostasis [1-4]. The various PGs are synthesised by the concerted action of cyclooxygenases (COXs) and specific prostaglandin synthases. The COXs convert the arachidonic acid released from membrane phospholipids to PGH<sub>2</sub>, which then serves as a common substrate for the prostaglandin synthases, including microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-1 (mPGES-1). Under pro-inflammatory conditions, COX-2 and mPGES-1 are both induced [5-8] and are mainly responsible for the elevated production of PGE<sub>2</sub> associated with pain and fever [8-11]. The co-induction of mPGES-1 and COX-2 has been demonstrated in several *in vitro* [5,12-16] and *in vivo* [17-19] models of inflammation, often with the peak of COX-2 expression preceding that of mPGES-1 [14-18]. *In vitro* cell transfection studies have suggested that mPGES-1 preferentially couples to COX-2 over COX-1 for the production of PGE<sub>2</sub> [20]. However, another study analyzing the effect of selective COX inhibitors on PGE<sub>2</sub> production in vascular smooth muscle cells recently concluded that mPGES-1 is not coupled to a particular COX isozyme [21], and, to date, there is no evidence of a direct protein-protein interaction between these two enzymes. Nonetheless, there is convincing evidence that mPGES-1 and COX-2 play a coordinated role in the increased PGE<sub>2</sub> production associated with inflammatory reactions.

In this study, we have characterized the oligomeric structures of mPGES-1 and of COX-2 using a novel photo-crosslinking approach in living cells. This strategy relies

on the use of photo-activatable amino acid analogues and has been successfully applied to demonstrate an interaction between membrane proteins PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1) and Insig-1 in COS7 cells [22]. Photo-methionine (photo-Met), one of these newly described photo-activatable amino acid analogues, was synthesized and fed to A549 cells. The photo-Met (see Fig. 1) contains a photo-activatable diazirine ring in its lateral chain and has been shown to be incorporated into nascent proteins by the cellular machinery [22]. Irradiation of the diazirine ring in photo-Met with UV light yields a highly reactive carbene species that rapidly reacts unspecifically with neighbouring molecules to form an irreversible covalent bond. Using this crosslinking approach, we show that COX-2 forms a dimer in intact cells, in agreement with previous *in vitro* data [23,24], and that mPGES-1 has an oligomeric structure that can be affected by the binding of a selective inhibitor. The photo-crosslinking data did not provide any evidence of direct protein-protein interaction between these two enzymes.

## Materials and methods

### *Materials*

Human A549 cells were purchased from ATCC (Manassas, VA) and all related cell culture reagents were from Mediatech Inc. (Herndon, VA), except FBS (fetal bovine serum) that was purchased from Hyclone International (Logan, UT). DMEM (Dulbecco's modified Eagle media) (without methionine, leucine, glutamine, or phenol red) was purchased as a custom order from SAFC Biosciences (Oakville, ON, Canada), and was supplemented with 0.8 mM leucine and 4 mM glutamine before use. Mouse monoclonal anti-COX-2 antibody (cat. #160112) was from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI), and HRP-coupled anti-mouse secondary antibody (cat. #NA931V) was from GE Healthcare Bio-Sciences (Baie d'Urfé, QC, Canada). Indomethacin, U-51605, and arachidonic acid were purchased from Cayman Chemicals. Calcium ionophore (A23187), and cell culture-tested leucine and methionine were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Complete protease inhibitor tablets were from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). DFU (5,5-dimethyl-3-(3-fluorophenyl)-4-(4-methylsulphonyl) phenyl-2(5*H*)-furanone) [25], MF63 (2-(6-chloro-1*H*-phenanthro[9,10-*d*]imidazol-2-yl)isophthalonitrile) [26], and a structurally-related inactive analogue of MF63 (2-(2-chloro-6-fluorophenyl)-1-methyl-1*H*-phenanthro[9,10-*d*]imidazole) (compound 12 in ref [26]) were synthesized at the Merck Frosst Centre for Therapeutic Research. The photo-Met used in our experiments was synthesized using the Strecker route starting from 4,4-azipental as described in [22]. The resulting DL-2-amino-5,5'-azi-hexanoic acid was acetylated, purified and incubated with porcine kidney

acylase I. L-2-Amino-5,5'-azi-hexanoic acid (photo-Met) was then purified by cation exchange chromatography (photo-Met is now commercially available from Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

#### *Production of monoclonal antibody against human mPGES-1*

Full length recombinant human mPGES-1 was purified as described [27] and was provided to Covance Research Products (Denver, PA) to generate monoclonal antibodies. Clones were selected for reactivity against human mPGES-1 using Western blotting and immunoprecipitation experiments. The selected antibody (MF-137) can immunoprecipitate (data not shown) and specifically detect human mPGES-1 by Western blotting (but has poor cross-reactivity against mouse mPGES-1).

#### *Cell culture and photo-crosslinking*

A549 cells were cultured in RPMI media supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Approximately  $2 \times 10^6$  cells were seeded in 10 cm Petri dishes and incubated in 10 ml media for 24 h. The cells were then washed with DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) and the media was replaced by 10 ml of methionine-free DMEM, supplemented with 5% dialyzed FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , and containing either 0.2 mM methionine or 1.7 mM photo-Met. Cells were then further incubated for 24 h. After this incubation, cells were washed with 10 ml DPBS to remove excess photo-Met and 10 ml fresh DPBS or methionine-free media was added. Different test compounds (as 100-fold concentrated solutions in DMSO) or vehicle (1% DMSO) were added for various

times before or after washing the cells. Then, photolysis of the photo-Met diazirine ring was achieved by exposing the cells to UV light (365 nm) for 30 sec at a distance of 3.5 cm using a Black Ray long wave UV lamp (model B100AP, UVP, Upland, CA). Supernatants were removed after photolysis, and the cells were collected by trypsination (2 ml of 0.25% trypsin/2.2 mM EDTA for 5 min) and were frozen as cell pellets at -80 °C.

#### *Sample preparation and Western blotting*

Frozen cell pellets were disrupted in 1 ml homogenization buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and 1× complete protease inhibitor mixture) by sonication (3 × 5 sec, Cole-Parmer ultrasonic homogenizer, 40% output). Lysates were subsequently centrifuged for 60 min at 90,000 g. Microsomal pellets were resuspended in homogenization buffer (brief sonication), and protein concentrations were determined by the DC-Lowry protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Samples were then diluted in homogenization buffer to normalize protein concentration, and an appropriate volume of 5× SDS electrophoresis loading buffer was added. Equal quantities of total protein were ran on Novex Tris-glycine pre-cast polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Invitrogen, ON, Canada). Human mPGES-1 and COX-2 were purified in our laboratories according to previously described procedures [27,28] and were used as controls. Blots were blocked for 1 h in 5% milk/PBST (PBS + 0.1% Tween 20) and were then incubated for 1 h with primary antibody in 1% milk/PBST (1:1000 for both MF-137 and Cayman's COX-2 antibody #160112). The blots were subsequently

washed with PBST and incubated with the proper secondary antibody for 1 h (sheep anti-mouse IgG, 1:100,000 for mPGES-1 and 1:20,000 for COX-2). Protein bands were detected on hyperfilm ECL (GE Healthcare Bio-Sciences) after incubation in SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Films were scanned using a GS-800 calibrated densitometer (Bio-Rad) and quantification of the intensity of the immunoreactive bands was accomplished with Quantity One 4.5.2 software (Bio-Rad).

#### *Determination of PGE<sub>2</sub> production by A549 cells and microsomes*

PGE<sub>2</sub> production by A549 cells was determined by quantifying PGE<sub>2</sub> levels in cell culture supernatants using a PGE<sub>2</sub> competitive immunoassay (Assay Designs, Ann Arbor, MI) following the manufacturer's instructions. The PGE<sub>2</sub> synthase activity of microsomal preparations from A549 cells cultured in presence of either photo-Met or methionine (and IL-1 $\beta$ ) for 24 h was determined by HPLC as previously described [27].

#### *Crosslinking with bifunctional crosslinkers*

Membrane permeable, bifunctional amine-reactive crosslinking agents DSS (disuccinimidyl suberate) and DFDNB (1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene) were obtained from Pierce Biotechnology and were dissolved in DMSO as 100 $\times$  concentrated solutions. Purified human mPGES-1 or human COX-2 were diluted respectively to 1.7 and 7.2  $\mu$ g/ml in 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1% DHPC (1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine). DFDNB (0.5 mM final) or DSS (0.5 or 2.5 mM final) were added to the enzyme preparations and were incubated at room temperature for 30



min. DFDNB crosslinking reaction was stopped by adding an appropriate volume of 5× SDS electrophoresis loading buffer, while DSS reaction was first quenched by adding a volume of 1 M Tris-HCl (pH 7.4) for 10 min (final concentration of 100 mM) before adding SDS electrophoresis loading buffer. For crosslinking in whole cells, A549 cells were plated in 10 cm Petri dishes and stimulated for 24 h with IL-1 $\beta$  as described above. Cells were then washed with DPBS and 10 ml fresh DPBS was added. DSS was added to the Petri dishes and cells were incubated for 30 min at 37 °C. Crosslinking reaction was stopped by adding 1 ml of 1 M Tris-HCl, pH 7.4 (100 mM final) and incubating for 10 min, then cells were collected and microsomes were prepared as described above.

## Results

### *Evidence for oligomeric structures of mPGES-1 and of COX-2 in IL-1 $\beta$ treated A549 cells*

A549 cells were chosen for crosslinking experiments because these cells constitutively express mPGES-1 [7] and show an increased synthesis of COX-2 and mPGES-1 following IL-1 $\beta$  treatment [5]. Photo-Met is a methionine analogue that is incorporated into nascent proteins by the cell's endogenous translational machinery [22] and, once activated by UV light, yields a highly reactive carbene that forms a covalent bond with nearby molecules (Fig. 1A). Excluding the initiator methionine, COX-2 and mPGES-1 contain respectively 14 [29] and 5 (Fig. 1B, [7]) methionine residues. In the following series of experiments, photo-crosslinking was performed in intact A549 cells, followed by preparation of microsomes to enrich the protein signals before detection by Western blotting. Figure 2A shows that microsomes from cells grown in the presence of photo-Met and IL-1 $\beta$ , but not UV-irradiated, contain a very strong immunoreactive band for COX-2 migrating with an apparent molecular weight of 80 kDa in the gel system used. Irradiation of the cells resulted in the generation of a higher molecular weight complex at approximately 185 kDa (Fig. 2A). The generation of the crosslink band was dependent on the growth of the cells with photo-Met and on UV irradiation. Its migration (apparent molecular weight of 185 kDa) was similar to that generated by treatment of purified human COX-2 with the chemical crosslinker DFDNB (apparent molecular weight of 180 kDa, Fig. 2B). These data are consistent with both the induction of COX-2 by IL-1 $\beta$  in these cells [5] and the dimeric structure of purified

COX-2 [23,24]. They indicate that the COX-2 dimeric structure also exists in intact cells and involves direct interactions between peptide chains that can be crosslinked by photo-activation of the modified methionine.

To characterize the structure of mPGES-1, both for the purified enzyme and in intact cells, we used chemical bifunctional and photo-activatable crosslinking approaches. Incubation of purified human mPGES-1 (17 kDa) with DSS resulted in the detection of a major dimer band (~33 kDa) and a weaker band (~45 kDa) corresponding to the molecular weight of a trimer (Fig. 3A). Interestingly, when DSS was used in intact A549 cells, the pattern of crosslinked proteins for mPGES-1 was identical to that of the purified enzyme (Fig. 3B). These data are consistent with mPGES-1 existing in a homotrimeric assembly, with higher crosslinking efficiency for the formation of the dimer compared to the trimer. Photo-crosslinking of mPGES-1 in A549 cells with photo-Met also resulted in the detection of higher molecular weight immunoreactive complexes. One complex at approximately 33 kDa corresponding to the dimer, and two complexes at 50 kDa and 55 kDa presumably corresponding to two different forms of the trimer were detected in microsomal preparations from cells treated with photo-Met and irradiated with UV, and the generation of these crosslinked bands was stimulated by IL-1 $\beta$ . The difference in the migration of these complexes compared to the DSS trimer could be due to differences in number or position of crosslinks (see discussion). Microsomes prepared from cells cultured with photo-Met had a similar level of PGE<sub>2</sub> synthase activity than that of microsomes prepared from cells cultured in methionine-containing media (4.8 and 5.8  $\mu$ mol PGE<sub>2</sub>/min/mg protein, respectively).

Overall, the data show that both mPGES-1 and COX-2 can form oligomeric structures in intact cells. No protein band that cross-reacted with both mPGES-1 and COX-2 antibodies was detected.

*Modulation of COX activity in A549 cells does not significantly alter the photo-crosslinking profiles of mPGES-1 and COX-2*

The effect of modulating enzyme activity on the photo-crosslinking of mPGES-1 and of COX-2 in intact A549 cells was then evaluated. PGE<sub>2</sub> production was stimulated using Ca<sup>2+</sup>-ionophore A23187 and arachidonic acid, or inhibited with the non selective COX inhibitor indomethacin and the selective COX-2 inhibitor DFU prior to photolysis. Treatment of cells with A23187 and 10 μM arachidonic acid resulted in a 6- and 10-fold increase in PGE<sub>2</sub> release, respectively (Fig. 4A and C), but did not significantly alter the photo-crosslinking patterns of mPGES-1 and COX-2 (Fig. 4B and D). Similarly, treatment of the cells with COX inhibitors indomethacin and DFU had only minor effects on the photo-crosslinking patterns of the two enzymes (Fig. 4F) at concentrations which completely suppressed PGE<sub>2</sub> synthesis (Fig. 4E).

*The structure of mPGES-1 is modified by a substrate analogue and by a selective inhibitor*

U-51605 is an analogue of the PGH<sub>2</sub> substrate of mPGES-1 (Fig. 5A) that was previously shown to inhibit the activity of recombinant mPGES-1 [30]. Treatment of A549 cells with U-51605 prior to photolysis resulted in a slight decrease of the high molecular weight complexes (50 and 55 kDa bands, Fig. 5B). This effect on the photo-

crosslinking of mPGES-1 was fairly small (0-40% decrease vs. vehicle depending on the experiment), as was the inhibition of PGE<sub>2</sub> production caused by U-51605 in whole cells (Fig. 5C). However, a more complete inhibition of PGE<sub>2</sub> production by treatment of the cells with the potent and selective mPGES-1 inhibitor MF63 (Fig. 6D, [26]), completely prevented the formation of the higher molecular weight photo-crosslinked complexes (50 and 55 kDa) (Fig. 6A) with a similar dose-dependency (Fig. 6B). Interestingly, densitometric analysis of the immunoreactive bands (Fig. 6B) also revealed that the reduction of the higher molecular weight complexes (50 and 55 kDa) by MF63 occurs at concentrations (IC<sub>50</sub> of 2.4 nM and 4.5 nM, respectively) close to those required for the inhibition of Ca<sup>2+</sup>-ionophore- or IL-1 $\beta$ -induced PGE<sub>2</sub> accumulation in cells (IC<sub>50</sub> = 44 nM (Fig. 6B) and 46 nM (Xu, D, Rowland, SE, Clark, P, Giroux, A, Côté, B, Guiral, S, Ducharme, Y, Friesen, RW, Methot, N, Mancini, J, Audoly, LP & Riendeau, D, in preparation), respectively). At higher doses (> 80 nM), the compound also caused an increase of the complex at 33 kDa and the appearance of a new band at approximately 45 kDa ( $\geq$  400 nM). In contrast to the effect of MF63, treatment of cells with high concentrations of a structurally-related inactive analogue of MF63 (Fig. 6D) did not eliminate the 50 and 55 kDa bands, nor did it stimulate the formation of the 33 and 45 kDa bands (Fig. 6A). Moreover, the dimer (~33 kDa) and trimer (~45 kDa) bands of mPGES-1 obtained by treatment of A549 cells with DSS were not altered by MF63 (Fig. 6C). These data suggest that the trimeric structure of mPGES-1 is maintained in intact cells in presence of the inhibitor and that the prevention of photo-crosslinking by MF63 is most likely due to conformational changes in the structure of mPGES-1 rather than to a complete dissociation of the subunits.

*MF63 acts as a crosslinker of mPGES-1 at high concentrations when irradiated with UV light*

Additional experiments were performed to elucidate the effects of suprainhibitory concentrations of MF63 on mPGES-1 that caused increased dimer formation and appearance of a new band at 45 kDa as observed in Fig. 6A. MF63 was found to be sensitive to the conditions of strong UV light irradiation at 365 nm that were used for the activation of the photo-Met which introduced changes in the spectral characteristics of the inhibitor (data not shown). Furthermore, UV irradiation of cells grown on regular methionine medium (in absence of photo-Met) resulted in specific crosslinking of mPGES-1 in the presence of MF63. In fact, the stimulation of dimer formation at 80 nM MF63 and the generation of the 45 kDa band at 2  $\mu$ M MF63 observed for the irradiated cells grown on methionine (Fig. 6E) were similar to those seen for cells grown on photo-Met (compare with Fig. 6A). These effects were not seen in the absence of UV irradiation (data not shown, see also Fig. 6C for the lack of effect of MF63 at these concentrations on DSS-treated cells) or with the inactive analog of MF63. These data indicate that MF63 acts as a crosslinker of mPGES-1 when UV irradiated and provide an independent confirmation that the enzyme can form a trimeric structure in intact cells.

## Discussion

We have used a recently developed technology, based on the incorporation of a photo-activatable methionine analogue into cellular proteins, to study protein-protein interactions of COX-2 and of mPGES-1 in IL-1 $\beta$  stimulated A549 cells. A single crosslink was obtained for COX-2, consistent with previous structural studies indicating a dimeric structure of this enzyme *in vitro* [23,24], and providing evidence that the COX-2 dimeric form can also exist in the cellular membrane environment. The high apparent molecular weight (~185 kDa) of the dimer on SDS-PAGE compared to the calculated one can be explained by a molecular sieving effect of the crosslink retarding protein migration during electrophoresis, as also observed with the chemical crosslinking of purified COX-2 yielding a protein complex with an apparent molecular weight of ~180 kDa.

The X-ray crystal structure of mPGES-1 has not yet been determined, but it has been proposed that this enzyme has a trimeric structure based on electron crystallography data and on characterization of the purified protein-detergent complex by ultracentrifugation [31]. Structures of other members of the MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) superfamily, of which mPGES-1 is part [7,32], have been published: the electron crystallography of rat microsomal glutathione transferase 1 (mGST-1) [33], and the recent X-ray crystal structures of human 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) [34] and of human leukotriene C<sub>4</sub> synthase (LTC<sub>4</sub>S) [35,36]. Each of these proteins has a trimeric structure. The overall similarities between the structures of mGST-1 and those of FLAP

and LTC<sub>4</sub>S, as well as the sequence conservation between the different MAPEG members further support the proposal that mPGES-1 exists as a trimer. Concordantly, the DSS crosslinking pattern obtained in this study for mPGES-1, with both purified protein and in whole cells, is consistent with a trimeric assembly. In addition, the crosslinking of mPGES-1 by MF63, a potent and highly selective inhibitor of the enzyme, yielded immunoreactive protein complexes of the same apparent MW than the DSS treatment, including the 45 kDa band corresponding to a trimer. The mechanism of the reaction is not known but might be due to presence of a phenyl ring bis-substituted nitrile groups that could become activated during strong irradiation at 365 nm. The crosslinking pattern observed for mPGES-1 using the photo-Met labelling in intact cells is also consistent with a trimeric organization. Photolysis leading to a single crosslinking event would produce a dimer (~33 kDa), which was the major immunoreactive band detected, and the bands at 50 and 55 kDa would correspond to resolved forms of two different trimeric complexes of mPGES-1. The parallel disruption of these two bands by the selective mPGES-1 inhibitor MF63 also supports the interpretation that they correspond to active forms of mPGES-1. The crosslinking efficiency was low, as typically observed for diazirine crosslinkers, which generate a reactive carbene that reacts with C-H bonds but that is also quenched by water and other components [37]. Plante et al. also observed a low crosslinking efficiency of FLAP to the dimer form in human neutrophils using a photo-reactive heterobifunctional crosslinker [38]. It should be noted that the average photo-Met incorporation into proteins has previously been estimated to be 0.7% [22], which, for mPGES-1 (152 amino acids), represents approximately 1 photo-Met residue incorporated per monomer.



The photo-Met might not necessarily always be inserted in the same position for each protein (mPGES-1 contains 5 methionines, excluding initiator Met), resulting in a heterogeneous population of mPGES-1. This heterogeneity could lead to the formation of different crosslinked complexes with distinct electrophoretic mobilities starting from a unique trimeric protein structure, explaining the generation of two bands (50 and 55 kDa) following photo-crosslinking. Alternatively, the different mobilities could reflect differences in the number of crosslinking events within the trimer (2 or 3) or two different conformations of mPGES-1. However, we can not rule out the possibility that the 50 and 55 kDa photo-crosslinked bands could correspond to an association of mPGES-1 with other unknown proteins.

As mentioned above, mPGES-1 is a member of the MAPEG family, from which the structure of two proteins, LTC<sub>4</sub>S and FLAP, have been elucidated by X-ray crystallography [34-36], providing some information on substrate and inhibitor binding sites. Both these proteins form symmetrical trimers with functional domains at the subunit interfaces. There are three active sites in LTC<sub>4</sub>S located at the interface between adjacent monomers, all including a glutathione binding site and a membrane-exposed hydrophobic pocket presumably allowing substrate binding. Similarly, for FLAP, there are three hydrophobic grooves located between adjacent subunits at the lipid exposed surface of the trimer. Within these grooves, the data are consistent with three bound inhibitor molecules. Interestingly, FLAP shows some sequence homology with mPGES-1 in the regions involved in inhibitor binding [6], and some of the indole inhibitors of FLAP, such as MK-886 [39], also act as weak inhibitors of mPGES-1 [6,40]. We have observed that a selective mPGES-1 inhibitor, and to a lesser extent a

PGH<sub>2</sub> analogue, prevent the photo-crosslinking by photo-Met leading to the 50 and 55 kDa bands, also suggesting that the inhibitor binding occurs at the interface between monomers and in agreement with the proposed trimeric structure. The inhibitor did not affect the crosslinking of mPGES-1 by a chemical bifunctional crosslinker, which suggests that MF63 causes a local conformational change in the oligomeric structure of mPGES-1 rather than a complete dissociation of the subunits. The existence of a conformational flexibility in the structure of mGST-1, the closest homologue of mPGES-1, has been suggested by analyzing two differentially packed 2D crystals of the protein [33].

In summary, our photo-crosslinking data in intact cells show that COX-2 exists as a dimer and that mPGES-1 can form an oligomer, most probably a homotrimer. No evidence of a protein complex between mPGES-1 and COX-2 was obtained by photo-crosslinking with photo-Met or by chemical crosslinking with DSS, which suggests that the coordinated role of these proteins in PGE<sub>2</sub> synthesis either does not involve a direct protein-protein interaction, or that such an interaction occurs in regions other than those labelled in the present experiments. The structure of mPGES-1 appears flexible in its membranar environment, with the binding of a selective inhibitor inducing conformational changes and most likely stabilizing the enzyme in an unproductive state. The present data also illustrate the remarkable sensitivity of the photo-crosslinking approach to detect inhibitor-induced protein conformational changes in cell membranes and its usefulness in detecting oligomeric structures.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank J.N. Morala for pilot work and for helpful discussions, as well as B. Côté along with the staff of the Medicinal Chemistry Department (Merck Frosst) for the synthesis of MF63 and DFU. This work was supported in part by studentships to P.O.H. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, and from the Department of Biochemistry at the Université de Montréal.

## References

- [1] C.D. Funk, *Science* 294 (2001) 1871-1875.
- [2] T.D. Warner, J.A. Mitchell, *FASEB J.* 18 (2004) 790-804.
- [3] D.L. Simmons, R.M. Botting, T. Hla, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 387-437.
- [4] h. fahmi, *Curr. Opin. Rheumatol.* 16 (2004) 623-627.
- [5] S. Thoren, P.J. Jakobsson, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6428-6434.
- [6] J.A. Mancini, K. Blood, J. Guay, R. Gordon, D. Claveau, C.C. Chan, D. Riendeau, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4469-4475.
- [7] P.J. Jakobsson, S. Thoren, R. Morgenstern, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 7220-7225.
- [8] K. Yamagata, K. Matsumura, W. Inoue, T. Shiraki, K. Suzuki, S. Yasuda, H. Sugiura, C. Cao, Y. Watanabe, S. Kobayashi, *J. Neurosci.* 21 (2001) 2669-2677.
- [9] S. Uematsu, M. Matsumoto, K. Takeda, S. Akira, *J. Immunol.* 168 (2002) 5811-5816.
- [10] C.E. Trebino, J.L. Stock, C.P. Gibbons, B.M. Naiman, T.S. Wachtmann, J.P. Umland, K. Pandher, J.M. Lapointe, S. Saha, M.L. Roach, D. Carter, N.A. Thomas, B.A. Durtschi, J.D. McNeish, J.E. Hambor, P.J. Jakobsson, T.J. Carty, J.R. Perez, L.P. Audoly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 9044-9049.
- [11] S.M. Jachak, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 8 (2007) 411-415.
- [12] R. Han, S. Tsui, T.J. Smith, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16355-16364.
- [13] E. Candelario-Jalil, A.C. Pinheiro de Oliveira, S. Graf, H.S. Bhatia, M. Hull, E. Munoz, B.L. Fiebich, *J. Neuroinflammation* 4 (2007) 25.
- [14] D.O. Stichtenoth, S. Thoren, H. Bian, M. Peters-Golden, P.J. Jakobsson, L.J. Crofford, *J. Immunol.* 167 (2001) 469-474.
- [15] F. Kojima, H. Naraba, S. Miyamoto, M. Beppu, H. Aoki, S. Kawai, *Arthritis Res. Ther.* 6 (2004) R355-R365.
- [16] F. Kojima, H. Naraba, Y. Sasaki, R. Okamoto, T. Koshino, S. Kawai, *J. Rheumatol.* 29 (2002) 1836-1842.
- [17] W. Inoue, K. Matsumura, K. Yamagata, T. Takemiya, T. Shiraki, S. Kobayashi, *Neurosci. Res.* 44 (2002) 51-61.

- [18] J. Guay, K. Bateman, R. Gordon, J. Mancini, D. Riendeau, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 24866-24872.
- [19] D. Claveau, M. Sirinyan, J. Guay, R. Gordon, C.C. Chan, Y. Bureau, D. Riendeau, J.A. Mancini, *J. Immunol.* 170 (2003) 4738-4744.
- [20] M. Murakami, H. Naraba, T. Tanioka, N. Semmyo, Y. Nakatani, F. Kojima, T. Ikeda, M. Fueki, A. Ueno, S. Oh, I. Kudo, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 32783-32792.
- [21] M. Camacho, E. Gerboles, J.R. Escudero, R. Anton, X. Garcia-Moll, L. Vila, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 1411-1419.
- [22] M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, *Nat. Methods* 2 (2005) 261-267.
- [23] R.G. Kurumbail, A.M. Stevens, J.K. Gierse, J.J. McDonald, R.A. Stegeman, J.Y. Pak, D. Gildehaus, J.M. Miyashiro, T.D. Penning, K. Seibert, P.C. Isakson, W.C. Stallings, *Nature* 384 (1996) 644-648.
- [24] C. Luong, A. Miller, J. Barnett, J. Chow, C. Ramesha, M.F. Browner, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 927-933.
- [25] D. Riendeau, M.D. Percival, S. Boyce, C. Brideau, S. Charleson, W. Cromlish, D. Ethier, J. Evans, J.P. Falguyret, A.W. Ford-Hutchinson, R. Gordon, G. Greig, M. Gresser, J. Guay, S. Kargman, S. Leger, J.A. Mancini, G. O'Neill, M. Ouellet, I.W. Rodger, M. Therien, Z. Wang, J.K. Webb, E. Wong, L. Xu, R.N. Young, R. Zamboni, P. Prasit, C.C. Chan, *Br. J. Pharmacol.* 121 (1997) 105-117.
- [26] B. Cote, L. Boulet, C. Brideau, D. Claveau, D. Ethier, R. Frenette, M. Gagnon, A. Giroux, J. Guay, S. Guiral, J. Mancini, E. Martins, F. Masse, N. Methot, D. Riendeau, J. Rubin, D. Xu, H. Yu, Y. Ducharme, R.W. Friesen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*(2007).
- [27] M. Ouellet, A. Pen, P.H. Ear, J.P. Falguyret, T.G. LeRiche, J.A. Mancini, D. Riendeau, M.D. Percival, *Adv. Exp. Med. Biol.* 525 (2003) 113-116.
- [28] M.D. Percival, M. Ouellet, C.J. Vincent, J.A. Yergey, B.P. Kennedy, G.P. O'Neill, *Arch. Biochem. Biophys.* 315 (1994) 111-118.
- [29] T. Hla, K. Neilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 7384-7388.
- [30] O. Quraishi, J.A. Mancini, D. Riendeau, *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 1183-1189.
- [31] S. Thoren, R. Weinander, S. Saha, C. Jegerschold, P.L. Pettersson, B. Samuelsson, H. Hebert, M. Hamberg, R. Morgenstern, P.J. Jakobsson, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 22199-22209.

- [32] P.J. Jakobsson, R. Morgenstern, J. Mancini, A. Ford-Hutchinson, B. Persson, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2000) S20-S24.
- [33] P.J. Holm, R. Morgenstern, H. Hebert, *Biochim. Biophys. Acta* 1594 (2002) 276-285.
- [34] A.D. Ferguson, B.M. McKeever, S. Xu, D. Wisniewski, D.K. Miller, T.T. Yamin, R.H. Spencer, L. Chu, F. Ujjainwalla, B.R. Cunningham, J.F. Evans, J.W. Becker, *Science* 317 (2007) 510-512.
- [35] H. Ago, Y. Kanaoka, D. Irikura, B.K. Lam, T. Shimamura, K.F. Austen, M. Miyano, *Nature* 448 (2007) 609-612.
- [36] D.M. Molina, A. Wetterholm, A. Kohl, A.A. McCarthy, D. Niegowski, E. Ohlson, T. Hammarberg, S. Eshaghi, J.Z. Haeggstrom, P. Nordlund, *Nature* 448 (2007) 613-616.
- [37] Y. Hatanaka, Y. Sadakane, *Curr. Top. Med. Chem.* 2 (2002) 271-288.
- [38] H. Plante, S. Picard, J. Mancini, P. Borgeat, *Biochem. J.* 393 (2006) 211-218.
- [39] J. Gillard, A.W. Ford-Hutchinson, C. Chan, S. Charleson, D. Denis, A. Foster, R. Fortin, S. Leger, C.S. McFarlane, H. Morton, H. Piechuta, D. Riendeau, C.A. Rouzer, J. Rokach, R. Young, D.E. MacIntyre, L. Peterson, T. Bach, G. Eiermann, S. Hopple, J. Humes, L. Hupe, S. Luell, J. Metzger, R. Meurer, D.K. Miller, E. Opas, S. Pacholok, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67 (1989) 456-464.
- [40] D. Riendeau, R. Aspiotis, D. Ethier, Y. Gareau, E.L. Grimm, J. Guay, S. Guiral, H. Juteau, J.A. Mancini, N. Methot, J. Rubin, R.W. Friesen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 3352-3355.

## Figure legends

Fig. 1. Structure of photo-methionine and sites of methionine incorporation in mPGES-1. A) Photo-methionine contains a photo-activatable diazirine ring in its lateral chain which is converted to a highly reactive carbene upon exposure to UV light. B) Amino acid sequence of human mPGES-1. The positions of the 5 methionines (excluding the initiator Met) in mPGES-1 are indicated by asterisks.

Fig. 2. Crosslinking of COX-2 to the dimeric form. A) Photo-crosslinking of COX-2 in intact cells. A549 cells were grown in the presence of methionine or photo-methionine, with or without IL-1 $\beta$ , for 24 h. Cells were then exposed to UV light for 30 sec to activate protein crosslinking and microsomes were prepared. Equal quantities of total microsomal proteins (11  $\mu$ g) were resolved by SDS-PAGE on a 6% polyacrylamide Tris-glycine gel and immunoreactive bands for COX-2 were detected by Western blotting. Purified human COX-2 (1 ng) was used as a standard (first lane). B) Crosslinking of purified COX-2 with 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene (DFDNB). Purified human COX-2 (7.2  $\mu$ g/ml) was incubated with DMSO (1%) or DFDNB (0.5 mM) for 30 min and 11.5 ng of protein was analyzed by Western blot.

Fig. 3. Chemical and photo-chemical crosslinking of mPGES-1. A) Crosslinking of purified mPGES-1 with disuccinimidyl suberate (DSS). Purified human mPGES-1 (1.7  $\mu$ g/ml) was incubated with DMSO (1%) or DSS (0.5 or 2.5 mM) for 30 min and 12 ng of protein was analyzed by Western blot. B) Crosslinking of mPGES-1 by DSS in intact

cells. A549 cells were treated with DMSO (1%) or DSS (0.5 mM) for 30 min and microsomes were prepared. Equal quantities of microsomal proteins (13  $\mu$ g) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting for mPGES-1 protein. Purified human mPGES-1 (0.6 ng) was used as a standard (first lane). C) Photo-crosslinking of mPGES-1 in intact cells. A549 cells were grown in the presence of methionine or photo-methionine, with or without IL-1 $\beta$ , for 24 h. Cells were then exposed to UV light for 30 sec to activate protein crosslinking and microsomes were prepared. Equal quantities of total microsomal proteins (11  $\mu$ g) were resolved by SDS-PAGE on a 10-20% polyacrylamide gradient Tris-glycine gel and immunoreactive bands for mPGES-1 were detected by Western blotting. Purified human mPGES-1 (0.4 ng) was used as a standard (first lane).

Fig. 4. Photo-crosslinking patterns of mPGES-1 or COX-2 in A549 cells under various conditions that affect PGE<sub>2</sub> production. A-B) Treatment of A549 cells with Ca<sup>2+</sup>-ionophore A23187 leads to a stimulation of PGE<sub>2</sub> production (A), but does not affect photo-crosslinking (B). PGE<sub>2</sub> concentrations were determined in the cell culture supernatants after a 30 min incubation with either DMSO (1%) or 2  $\mu$ M A23187, and are displayed as fold increase over vehicle (n=2). Equal quantities of total microsomal proteins (17  $\mu$ g for mPGES-1 and 13  $\mu$ g for COX-2) were analyzed as described in the legend of Fig. 2. C-D) Arachidonic acid increases PGE<sub>2</sub> production in A549 cells (C) without modifying the photo-crosslinking patterns (D). The PGE<sub>2</sub> concentrations in the culture supernatants (after 20 min incubation) are reported as fold increase over ethanol vehicle (n=1). Fixed amounts of total microsomal proteins (34  $\mu$ g and 25  $\mu$ g) were used



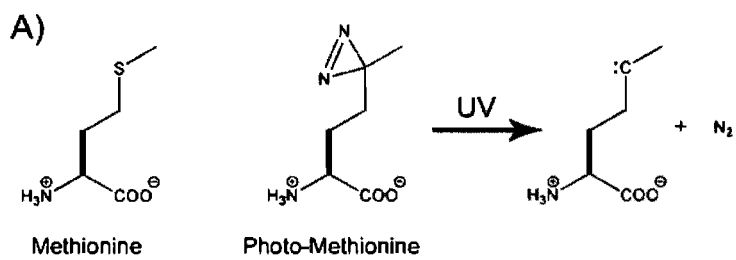
for mPGES-1 and COX-2 analyses, respectively. E-F) Effect of COX inhibitors on the photo-crosslinking of mPGES-1 or COX-2 (F) at concentrations which effectively inhibit  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore induced  $\text{PGE}_2$  production in A549 cells (E). Equal quantities of total microsomal proteins (25  $\mu\text{g}$  for mPGES-1 and 19  $\mu\text{g}$  for COX-2) were analyzed. The inhibition by indomethacin or DFU of  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore-induced (2  $\mu\text{M}$ , 30 min)  $\text{PGE}_2$  production in A549 cells was determined following 30 min pre-incubation with inhibitors, in the same conditions as those used for photo-crosslinking (n=2).

Fig. 5. Modification of the photo-crosslinking pattern of mPGES-1 by a  $\text{PGH}_2$  substrate analogue. A) Structure of U-51605, a stable  $\text{PGH}_2$  analogue. B) Effect of U-51605 on mPGES-1 photo-crosslinking pattern. A549 cells were treated with DMSO (1%) or U-51605 for 20 min and were then exposed to UV for 30 sec. Equal quantities (26  $\mu\text{g}$ ) of microsomal proteins were analyzed. Purified human mPGES-1 (0.4 ng) was used as a standard (first lane). C) Inhibition by U-51605 of  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore-induced (2  $\mu\text{M}$ , 30 min)  $\text{PGE}_2$  production in A549 cells (n=2).

Fig. 6. Modification of the photo-crosslinking pattern of mPGES-1 by a selective inhibitor. A) Effect of MF63 on mPGES-1 photo-crosslinking in intact cells. A549 cells were treated with DMSO vehicle (1%), different concentrations of MF63, or a structurally-related inactive analogue of MF63 for 20 min and were then exposed to UV for 30 sec. Equal quantities (31  $\mu\text{g}$ ) of microsomal proteins were analyzed. Purified human mPGES-1 (0.6 ng) was used as a standard (first lane). B) Densitometric analysis of the immunoreactive band intensities. The intensity of the bands at ~50 ( $\blacktriangledown$ ) and 55

(■) kDa are plotted as the percentage of those measured in cells treated with DMSO vehicle (solid lines). The inhibition by MF63 of  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore-induced (2  $\mu\text{M}$ , 30 min)  $\text{PGE}_2$  production (●), obtained in the same conditions as the photo-crosslinking experiments, is also illustrated (dashed line, n=2). C) Effect of MF63 on crosslinking of mPGES-1 by DSS in intact cells. A549 cells pre-treated with DMSO (1%), different concentrations of MF63, or of a structurally-related inactive analogue of MF63 for 20 min were treated with DSS (2.5 mM) for 30 min. Equal quantities of microsomal proteins (13  $\mu\text{g}$ ) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting for mPGES-1 protein. D) Structures of MF63, a potent and selective inhibitor of mPGES-1, and of an inactive analogue of MF63. E) Photo-crosslinking of mPGES-1 in the presence of MF63. Cells were grown in media containing methionine (in absence of photo-Met) and irradiated in the absence or presence of 80 nM or 2  $\mu\text{M}$  MF63. Equal quantities of microsomal proteins (35  $\mu\text{g}$ ) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting for mPGES-1 protein.

## FIGURES

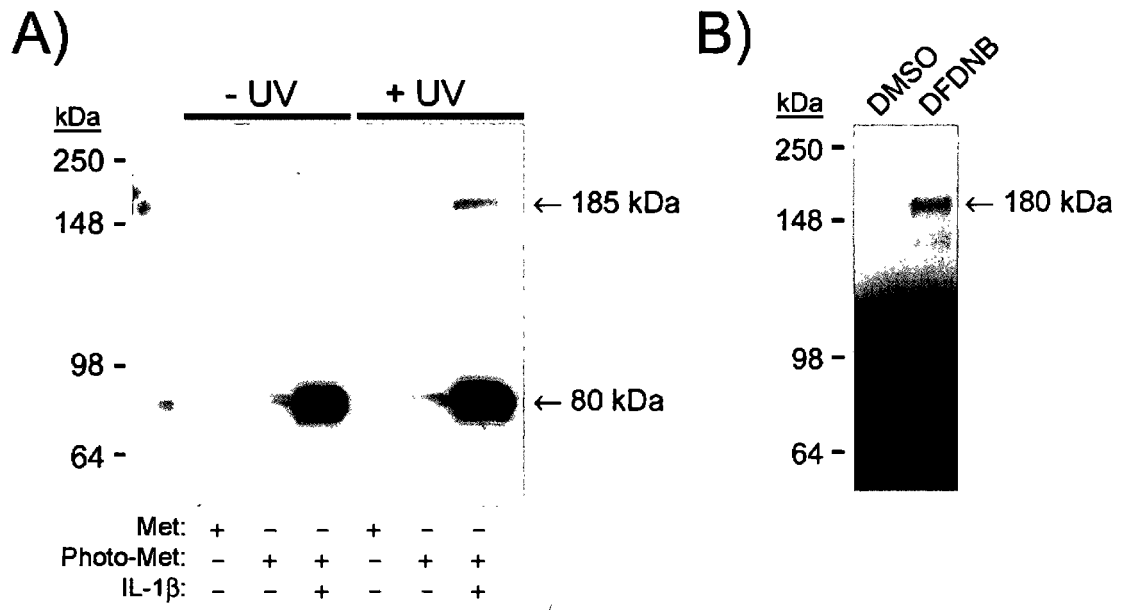
**Figure 1**

B)

```

1         11         21         31
|         |         |         |
MPAHS LVMSS PALPA FL L CSTLL VIKMYVVA IITGQVRLR
*
41        51        61        71
|         |         |         |
KKA FANPEDALRHGGPQYCRSDPDVERCLRAHRNDMETIY
*
81        91        101       111
|         |         |         |
PFLFLGFVYSFLGPNPFVAVMMHFLVFLVGRVAHTVAYLGK
*
121       131       141       151
|         |         |         |
LRAPIRSVTYTLAQLPCASMALQILWEAARHL
*

```

**Figure 2**

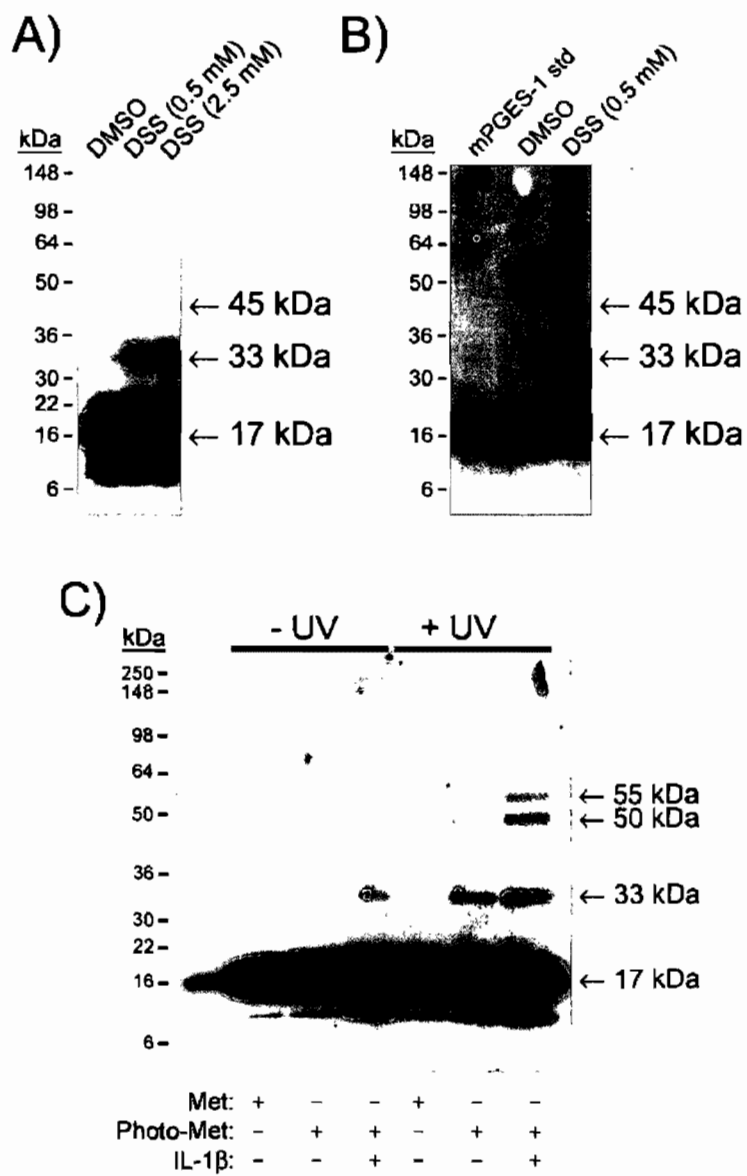
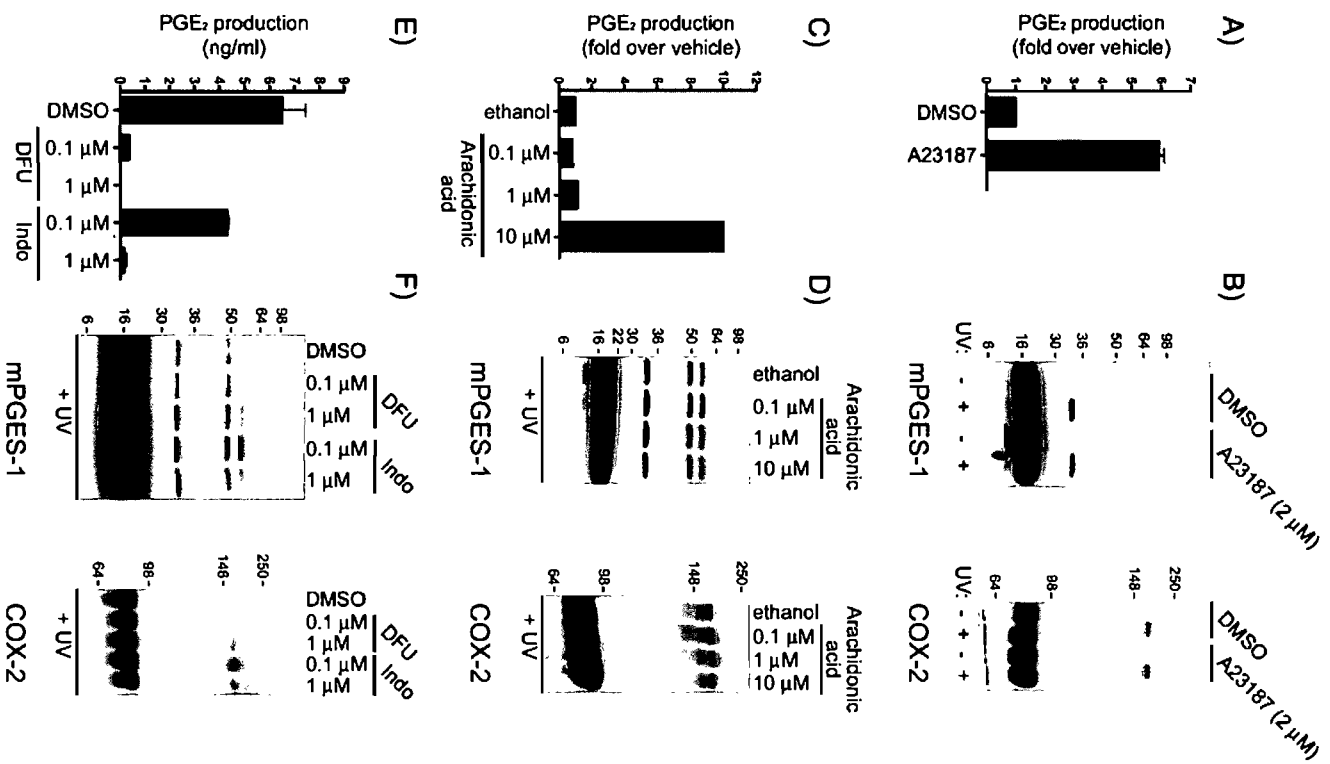
**Figure 3**

Figure 4



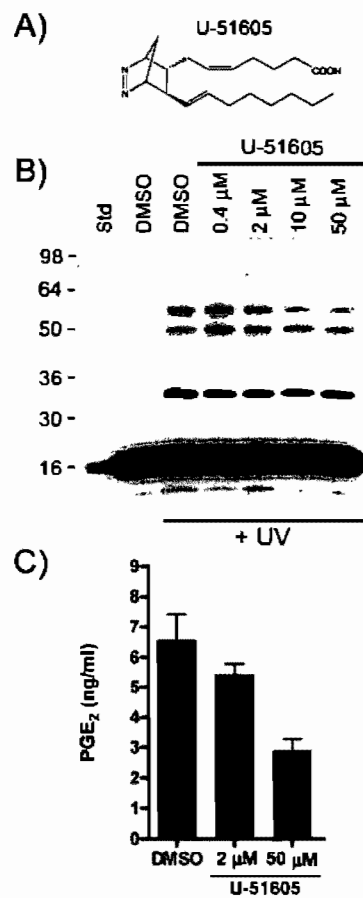
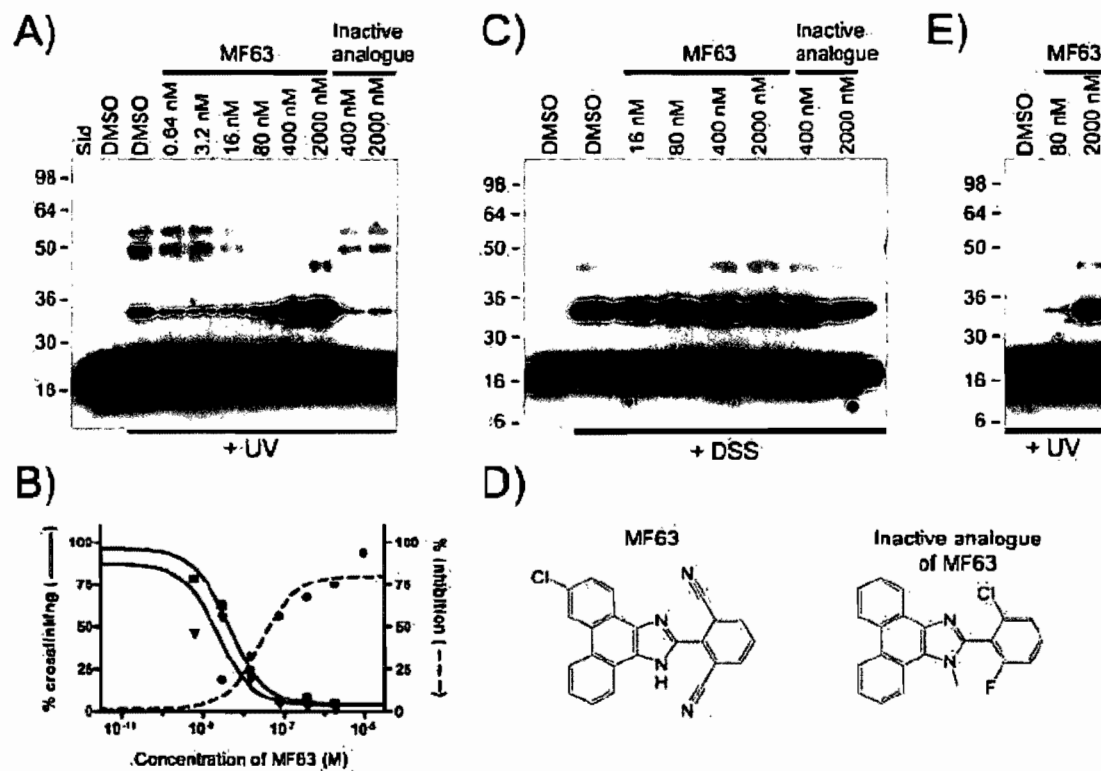
**Figure 5**

Figure 6





## CHAPITRE 7.

### **Double-label expression studies of prostacyclin synthase, thromboxane synthase and COX isoforms in normal aortic endothelium**

Kawka, D.W., Ouellet, M., Héту, P.O., Singer, I.I. et Riendeau, D. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, 1771:45-54.

#### Contribution des auteurs:

Douglas W. Kawka: Détection de COX-1, COX-2, PGIS et TXS par immunohistochimie dans l'endothélium vasculaire (chien, rat et humain).

Marc Ouellet: Caractérisation des anticorps nécessaires aux études d'immunohistochimie dans les tissus de chien.

Pierre-Olivier Héту: Mesure des niveaux de PGI<sub>2</sub> et de TXA<sub>2</sub> dans l'aorte de rats traités avec des inhibiteurs sélectifs de COX-1 ou COX-2. Démonstration de la sélectivité de l'anticorps de COX-2 par immunobuvardage dans des cellules mononucléaires de chien.

Irwin I. Singer: Supervision des expériences d'immunohistochimie et rédaction du manuscrit.


Denis Riendeau: Supervision générale du projet et rédaction du manuscrit.

**Double-label expression studies of prostacyclin synthase, thromboxane synthase and COX isoforms in normal aortic endothelium**

**Douglas W. Kawka<sup>a</sup>, Marc Ouellet<sup>b</sup>, Pierre-Olivier Héту<sup>b</sup>, Irwin I. Singer<sup>a</sup>, and Denis Riendeau<sup>b,\*</sup>**

<sup>a</sup> Departments of Immunology & Rheumatology, Merck Research Laboratories, Rahway, NJ

<sup>b</sup> Department of Biochemistry & Molecular Biology, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Kirkland, QC, Canada.

\* Corresponding author: Merck Frosst Centre for Therapeutic Research  
16711 Trans Canada Hwy, Kirkland, QC,  
Canada, H9H 3L1  
Phone: 1-514-428-2673  
Fax: 1-514-428-4930  
E-mail: 

*Keywords:* Cyclooxygenase, Prostacyclin synthase, Vascular endothelium, Prostacyclin, Thromboxane

*Abbreviations:* PGI<sub>2</sub>, prostacyclin; PGIS, prostacyclin synthase; TX, thromboxane; TXS, thromboxane synthase; COX, cyclooxygenase; IP, prostacyclin receptor; TP, thromboxane receptor

**Abstract**

We have performed double-label immunofluorescence microscopy studies to evaluate the extent of co-localization of prostacyclin synthase (PGIS) and thromboxane synthase (TXS) with cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in normal aortic endothelium. In dogs, COX-2 expression was found to be restricted to small foci of endothelial cells while COX-1, PGIS and TXS were widely distributed throughout the endothelium. Quantification of the total cross-sectioned aortic endothelium revealed a 6- to 7-fold greater expression of COX-1 relative to COX-2 (55 vs 8%) and greater co-distribution of PGIS with COX-1 compared to COX-2 (19 vs 3%). These results are in contrast to the extensive co-localization of PGIS and COX-2 in bronchiolar epithelium. In rat and human aortas, immunofluorescence studies also showed significant COX-1 and PGIS co-localization in the endothelium. Only minor focal COX-2 expression was detected in rat endothelium, similar to the dog, while COX-2 was not detected in human specimens. Inhibition studies in rats showed that selective COX-1 inhibition caused a marked reduction of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and TXB<sub>2</sub> aortic tissue levels, while COX-2 inhibition had no significant effect, providing further evidence for a functionally larger contribution of COX-1 to the synthesis of prostacyclin and thromboxane in aortic tissue. The data suggest a major role for COX-1 in the production of both prostacyclin and thromboxane in normal aortic tissue. The extensive co-localization of PGIS and COX-2 in the lung also indicates significant tissue differences in the co-expression patterns of these two enzymes.

## 1. Introduction

Thromboxane (TX) $A_2$  and prostacyclin (PGI $_2$ ) are key components of blood flow regulation, vascular tone and platelet function. PGI $_2$  is a potent vasodilator and inhibitor of platelet aggregation, while TXA $_2$  is a vasoconstrictor and platelet agonist. Their importance in modulating vascular function has been demonstrated by genetic deletion of the prostacyclin (IP) and thromboxane (TP) receptors [1,2]. For example, deletion of the IP receptor stimulates atherogenesis [2] and tissue hyperplasia in response to injury [1], effects that are reduced by knockout of the TP receptor. The alteration of the PGI $_2$ /TXA $_2$  balance due to inhibition of PGI $_2$  synthesis by coxibs has been proposed as the mechanism to explain the cardiovascular side-effects associated with the chronic use of this class of anti-inflammatory agents [3].

Cyclooxygenases (COX) exist as two major isoforms (COX-1 and COX-2), both of which have been implicated in the production of prostanoids in the vasculature [4-7]. COX-2 is inducible in cultured endothelial cells and human vessels following stimulation by IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , and other conditions [5-10] and has been reported to preferentially couple with prostacyclin synthase (PGIS) for the cellular synthesis of PGI $_2$  [11,12]. It has been shown that endothelial COX-2 is up-regulated by steady laminar shear stress [8,10,13,14], suggesting that it might be the major isoform responsible for the production of PGI $_2$  under physiological conditions [8,15]. In addition, selective COX-2 inhibitors have been shown to decrease the excretion of urinary metabolites of PGI $_2$  by about 60-70% in normal volunteers without effects on urinary TXA $_2$  metabolites [15-17]. Based on these observations, the concept has

emerged that the vascular endothelium (a rich source of PGIS [18,19]) is the main source of COX-2 dependent systemic PGI<sub>2</sub> production [15,20,21].

While the studies cited above are suggestive of a major role for COX-2 in the generation of prostacyclin in normal vasculature, other observations suggest a role for COX-1. Immunohistological studies show that normal vasculature contains predominantly or exclusively COX-1 [22,23], with COX-2 being detectable at elevated levels in atherosclerotic plaques [22,24] or injured tissues [25,26]. In addition, biochemical studies on the effect of selective COX-1 and COX-2 inhibitors on rabbit aortic tissue preparations in vitro have shown that the PGI<sub>2</sub> production in this tissue is mediated by COX-1 [23], and tissues other than arterial vessels have been proposed as sources of COX-2 mediated PGI<sub>2</sub> synthesis [27,28]. The data on this topic have been critically reviewed recently [29] and have highlighted the need for a better characterization of the predominant isoforms of COX expressed within the vasculature and their relationship with PGIS in order to understand the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 inhibitors in the cardiovascular system.

In order to further define the relationships between each COX isoform and the two terminal synthases involved in the synthesis of PGI<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub> in the vascular endothelium, we have performed quantitative double-label immunofluorescence microscopic experiments on the aortas and carotid arteries of healthy dogs. Additional double-labeling experiments were also performed on normal rat and human aortas. This method permits detection of the number of PGIS-positive aortic endothelial cells co-

expressing COX-1 versus COX-2, and allows for the first time an in situ determination of the degree to which COX-2 expression is associated with that of vascular PGIS. Our data indicate that only minor amounts of COX-2 are coincident with PGIS and that COX-1 is the major COX isoform that co-localizes with PGIS in the aortic endothelium.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *Animals and preparation of tissues*

All procedures for studies in dog were approved by the MRL Rahway Institutional Animal Care and Use Committee. Dogs were housed in AAALAC accredited facilities in accordance with *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health and in compliance with all federal, state and local regulations. Tissues were obtained from eight normal male beagle dogs (6 months to 5 years old) that were euthanized by an i.v. overdose of pentobarbital sodium. To minimize the possibility of COX-2 induction in diseased or injured tissues, complete veterinary records were obtained for each dog on study indicating that every animal was healthy. Blocks of tissues were fixed in 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 at 4°C for a total of 4 h. Fixed tissues were gradually infused with 20% sucrose plus 5% glycerol in phosphate buffer pH 7.2. The tissue was then placed in O.C.T. compound, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Segments of aortas were excised and embedded in cross section. Aortic segments containing the branch point of the carotid artery, the iliac bifurcation, and the aortic branch points of the renal arteries were dissected from three dogs and were processed as above. One lobe of the lung was inflated with 4% formaldehyde, infiltrated with sucrose, and frozen as described above. All tissues were cut into 5 µm frozen sections. Male Sprague-Dawley rats (10 weeks old, 250-300 g, Taconic Farms, Germantown, NY) were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation, and specimens of aorta and

kidney were fixed in 4% formaldehyde and processed for immunofluorescence microscopy as described for dogs. Specimens of human aorta (42, 51, and 58 year old females) were obtained within 6 hrs. of a fatality, fixed in neutral buffered formalin, and embedded in paraffin (US Biomax, Inc., Rockville, MD). Sections of all human aortae were evaluated by a pathologist and found to be completely normal. In addition, formaldehyde-fixed paraffin-embedded samples of human inflammatory bowel disease tissues were used as positive controls for expression of human COX-2 as described previously [30].

All procedures for pharmacological studies in rats were approved by the Animal Care Committee at the Merck Frosst Centre for Therapeutic Research and respected the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care. SC-560 [31] and MF tricyclic [32] were administered orally to male Sprague-Dawley rats (225-275 g, Charles River, St-Constant, QC, Canada) in 0.5% methylcellulose (10 ml/kg) for 4 h at doses of 10 and 5 mg/kg, respectively. Animals were euthanized by injection of pentobarbital (120 mg/kg. i.p.) and aortic tissue was collected in the presence of indomethacin and processed for prostaglandin analysis by mass spectrometry as previously described [33]. Levels of MF tricyclic were determined by RP-HPLC to confirm exposure (plasma and aortic tissue extracts concentrations of 3.1 and 4.1  $\mu\text{M}$ , respectively, 4 h post-administration).



## 2.2. Immunohistochemistry

To block non-specific labeling, sections were treated with 5% donkey serum in PBS for 20 min, then with a clarified solution of 5% non-fat dry milk for 30 min, and finally with Fc blocker (Accurate Chemical, Westbury, NY) for 20 min. Paraffin sections were pretreated with citrate antigen retrieval solution as specified (Biogenex Labs, San Ramon, CA). Sections were labeled for 1 h with affinity purified primary antibodies or appropriate IgG controls (0.5-10  $\mu\text{g/ml}$ ). COX-1 and COX-2 immunolocalization experiments were performed using the following antibodies: goat anti-human COX-1 (cat. #sc1752, Santa Cruz, CA) for labeling of dog and human tissues; goat anti-mouse COX-1 (cat. #sc1754, Santa Cruz) for labeling of rat tissues; mouse anti-human COX-2 monoclonal antibody (cat. #160112, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) for labeling of dog and human tissues; goat anti-mouse COX-2 (Santa Cruz, cat. #sc 1747) for staining of rat tissues. PGIS and TXS immunolocalization experiments in all three species were performed with the following antibodies: rabbit anti-bovine PGIS (cat. #160640) and rabbit anti-human thromboxane synthase (cat. #160715), both obtained from Cayman Chemical. To further validate their staining patterns, additional immunolabeling experiments were performed in dog tissue with the following antibodies: rabbit anti-ovine COX-1, mouse monoclonal anti-ovine COX-1 and rabbit anti-human COX-2 from Cayman Chemical, mouse monoclonal anti-ovine COX-1 (Santa Cruz), and rabbit anti-rat COX-2 (Upstate Biotechnology). All COX-1 reagents detected high levels of COX-1 expression, while COX-2 IgGs showed low amounts of COX-2 labeling in the aortic endothelium. All non-immune IgG controls

were obtained from Jackson Laboratories (West Grove, PA) with the exception of mouse IgG<sub>1</sub> that was purchased from Zymed (South San Francisco, CA). Slides were washed and incubated with affinity purified F(ab')<sub>2</sub> anti-goat, anti-mouse or anti-rabbit donkey IgGs conjugated to either Cy3 (red fluorescence), Cy5 (green fluorescence), or biotin (5 µg/ml, 30 min) obtained from Jackson Laboratories. For double-labeling studies, two primary antibodies derived from different species, and corresponding species-specific fluorescent secondary antibodies were mixed together and incubated simultaneously on each slide. Non-immune IgG controls were also run in this fashion. Coverslips were mounted on the slides with Vectashield plus DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) nuclear stain (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Immunolabeling with a goat-anti mouse PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1) antibody (Santa Cruz) was used to demonstrate that the aortic endothelium was intact.

### *2.3. Blocking Experiments*

The following reagents were used to assess the specificity of the primary antibodies: human and mouse COX-1 peptides (Santa Cruz), purified ovine COX-1, human COX-2 peptide, bovine PGIS and human thromboxane synthase peptide (Cayman Chemical), as well as purified human COX-2 [34]. Specificity was demonstrated by preincubating each primary antibody at staining concentrations with its relevant or irrelevant peptide, or purified COX isoform, at 10 µg/ml for 1 h, and followed by centrifugation for 1 h at 13,500 g at 4°C. The COX-1 immunostaining was blocked by pre-incubation with its specific peptide, but not by a non-homologous mouse

COX-1 peptide (not shown). Endothelial COX-2 labeling was inhibited by its relevant peptide or by purified human COX-2, but not by its irrelevant peptide or by ovine COX-1 (not shown). PGIS and TXS labeling were also inhibited by pre-treatment with their respective relevant peptides, but not by irrelevant peptides (not shown).

#### *2.4. Immunoperoxidase ABC staining*

To block endogenous peroxidases, frozen serial sections were treated with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 5 min. The slides were then stained with either COX-1, COX-2, or PGIS primary antibodies as described above, washed, and incubated with corresponding species-specific biotinylated secondary antibodies for 30 min. Sections were then treated with Vectastain ABC solution (Vector Labs), followed by diaminobenzidine/nickel enhancement, washing, eosin counterstaining, dehydration, and coverslip mounting in Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

#### *2.5. Quantification*

Sections were photographed and analyzed blindly with an Everest imaging system from Intelligent Imaging Innovations, Inc. (Denver, CO) equipped with a Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Digital fluorescent micrographs were obtained with a 40X Zeiss Plan Neofluar objective lense (n.a.=0.75), a Photometrics Coolsnap 2 CCD camera, and Slidebook 3.0.11 image acquisition and processing software (Intelligent Imaging Innovations, Inc.). This system allows the

observer to visualize two different fluorochrome conjugated secondary antibodies individually or in combination on the same section. The region labeled by each fluorochrome within the aortic endothelium was delineated with the marking tool function of the program, and the area it encompassed was calculated. The program also provides the ability to measure the area of overlap of selected combinations of fluorochromes. The perimeter of the aortic endothelium was measured, and used to determine the percentage of total endothelium labeled with each fluorochrome either independently, or in combination. The data was then unblinded and identified as either COX-1, COX-2, PGIS, COX-1 plus PGIS or COX-2 plus PGIS.

#### *2.6. Immunodetection of COX-2 in LPS-stimulated dog mononuclear cells*

Mononuclear cells were isolated from heparinized dog whole blood by density gradient centrifugation over Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, QC, Canada). Briefly, 30 ml of dog whole blood was diluted 1:1 with Ca/Mg-free PBS and this diluted blood was then layered carefully over Ficoll-Paque PLUS in 50 ml falcon tubes (2 tubes containing 30 ml diluted blood over 15 ml Ficoll-Paque). The tubes were centrifuged at 400 g for 35 min at room temperature. The mononuclear cells form a cloudy monolayer between the plasma upper phase and the lower red pellet of granulocytes and erythrocytes. The upper phase was then aspirated and discarded, and the mononuclear cell fraction was collected, washed three times with PBS and was resuspended in 10 ml of serum-free RPMI media. Cells were then counted and diluted to  $2 \times 10^6$  cells/ml. The cells were then treated with 100  $\mu\text{g/ml}$  LPS (*E. coli* LPS,

serotype O111:B4 from Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) or vehicle (PBS + 0.1% BSA) for 24 h at 37°C. After 24 h, the cells were pelleted by centrifugation at 400 g for 5 min, washed once with PBS, and lysed by sonication in 1 ml TSEG buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.4; supplemented with 0.25 M sucrose, 0.1 mM EDTA, 1 mM reduced glutathione, and 1× Roche Complete<sup>®</sup> protease inhibitor mixture). The cell lysates were then centrifuged at 1,000 g for 10 min and the supernatants were further centrifuged at 100,000 g for 1 h. The resulting microsomal pellets were resuspended in 75 µl TSEG buffer and protein content was determined by a modified Bradford method (Bio-Rad protein assay). The expression of COX-2 in these two samples was determined by SDS-PAGE and immunoblotting with the mouse anti-human COX-2 monoclonal antibody used for the dog immunohistochemistry experiments (primary COX-2 Ab: 1:1,000 dilution; secondary sheep anti-mouse IgG antibody, 1:20,000 dilution). To verify loading, the blot was probed for cyclophilin B (primary Ab: rabbit anti-Cyclophilin B antibody, Abcam, Cambridge, MA, 1:2,000 dilution; secondary donkey anti-rabbit IgG antibody, 1:50,000 dilution) after stripping for 30 min at 50°C in 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, and 0.7% β-mercaptoethanol. All immunodetected bands were revealed with SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, U.S.A.).

### 3. Results

#### 3.1. *Expression of COX-1, COX-2, PGIS, and TXS in the dog aortic endothelium*

Detailed immunolabeling experiments were performed to investigate COX-2 expression in dog aortic endothelium. The large size of dog aortic vessels ensures that 1) specific regions (i.e. branch point of the carotid artery) could be reproducibly dissected out, and that 2) a sizeable cross-sectional area of aortic endothelium would be available to provide statistically significant measurements of PGIS expression relative to the COX isoforms. Dual-label immunofluorescence microscopic studies of COX-1, COX-2, PGIS, and thromboxane synthase (TXS) expression within the normal dog aortic endothelium were performed on at least 360 complete aortic cross-sections obtained from 8 dogs. High levels of widespread COX-1 (Fig. 1A) and PGIS (Fig. 1B) expression were observed in the dog endothelia; only minor labeling of these proteins was seen in the media. COX-1 was expressed throughout the endothelial cell cytoplasm in a peri-nuclear pattern (arrowheads in Fig. 1A). Intense COX-1/PGIS double-labeling was detected throughout the entire endothelium depicted in the microscopic field (Fig. 1C). In contrast, most adjacent sections of the aortic endothelium did not exhibit COX-2 labeling (Fig. 1D) while the expression of PGIS was clearly detectable (Fig. 1E). Additional experiments were conducted to ensure that the anti-human COX-2 antibody used for COX-2 localization in dog tissues was capable of recognizing both human and dog COX-2. As shown in Fig. 2, the COX-2 antibody recognized both purified human COX-2, and COX-2 expressed by LPS-treated dog mononuclear cells. In addition, the

COX-2 immuno-probe also intensely stained the macula densa of dog kidney (data not shown), a region known to express high levels of COX-2 [35,36].

Although endothelial COX-2 was generally not present in the field of view, when observed, relatively minor amounts of COX-2 immunostaining were restricted to small punctate foci, examples of which are shown for the aorta and carotid artery in Figs. 1G and 3A, respectively. The dominant COX-1 expression pattern was consistently observed with 4 different COX-1 antibodies, while minor focal endothelial COX-2 labeling was detected with each of the 3 COX-2 immuno-probes (data not shown). The COX-2 staining did not fill the entire endothelial cell cytoplasm, and did not label every endothelial cell in the field of view (Figs. 1G, 3A and 4D). Some of these minor COX-2 foci were coincident with PGIS labeling (Figs. 1I and 3C). Likewise, COX-1 and TXS exhibited widespread co-expression (Fig. 4A-C), while only small foci of COX-2 labeling were coincident with TXS in the dog aortic endothelium (Fig. 4D-F).

### *3.2. Expression of COX-2 and PGIS in arterial regions of high shear stress*

The co-distribution of COX-2 and PGIS was also studied in regions of the vascular endothelium usually subjected to high shear stress *in vivo* (i.e. at sites where the common carotid artery branches off of the aorta). The relative quantities and patterns of COX-2 and PGIS co-expression in these regions of elevated shear stress (Fig. 3) were low and similar to those described for the aortic endothelium (above). In addition, the following regions of high shear stress were examined: the aortic site of

bifurcation of the iliac arteries, and the points at which the renal arteries insert into the aorta. The endothelium at these regions of physiologically elevated laminar shear stress showed levels and patterns of COX-2/PGIS co-expression that were very similar to those observed at the branch points of the carotid artery (data not shown).

### *3.3. Quantification of COX-1, COX-2 and PGIS in the dog aortic endothelium*

A quantitative analysis of COX-1, COX-2, and PGIS expression in double-labeled aortic frozen sections was assessed by image analysis, and is shown in Fig. 5. High levels of COX-1 expression were detected, corresponding to  $55 \pm 6\%$  of the total aortic endothelium, while only  $8 \pm 2\%$  of the endothelium exhibited COX-2 expression. Thus, COX-1 expression was 7-fold higher than COX-2 expression in the normal dog aortic endothelium. Significantly, the percentage of the total sampled aortic endothelium showing co-localization of COX and PGIS was  $19 \pm 3\%$  for COX-1 and only  $3 \pm 1\%$  for COX-2 representing a 6-fold higher co-distribution of PGIS with COX-1. Despite this difference in co-localization, the expression of PGIS observed in adjacent sections remained relatively stable ( $42 \pm 5\%$  for COX-1/PGIS double-labeling experiments and  $36 \pm 3\%$  for the COX-2/PGIS dual labeled sections). The total expression of PGIS was significantly higher than the fractions of PGIS that co-localized with either COX-1 or COX-2. Similar levels of COX-2/PGIS co-expression were observed in the aortic endothelia of 6 month old and 5 year old dogs:  $2.9 \pm 1.1\%$  vs.  $3.4 \pm 1.1\%$  ( $n=3$ ,  $\pm$  S.E.M.).



### *3.4. Expression of COX-2 and PGIS in the lung*

To compare the immunolabeling pattern of the aortic endothelium with that of another tissue expressing a high level of COX-2 [37,38] and PGIS [18,19], additional experiments were conducted on lung tissue. Bronchiolar epithelia of normal dog lungs exhibited widespread uniformly intense COX-2 expression via immunoperoxidase microscopy (Fig. 6A). Double-label immunofluorescence experiments using the same methodology as that used for the aortic tissue demonstrated an extensive co-expression of COX-2 and PGIS labeling throughout the bronchiolar epithelium within the same section (Fig. 6B-D).

### *3.5. Expression of COX-1, COX-2, and PGIS in human aortic endothelium*

Additional dual-immunofluorescence experiments were performed with normal human aortas (Fig. 7). PGIS was expressed both in the endothelium and in the media (Fig. 7B,E). Intense co-expression of COX-1 and PGIS (Fig. 7A-C) was observed throughout the aortic endothelium, whereas corresponding serial sections did not show COX-2 labeling (Fig. 7D-F), even though our antibodies detected abundant COX-2 expression in the colonic epithelium and leukocytes of human inflammatory bowel disease (IBD) tissue (Fig. 7G-I) as previously demonstrated [30].

### 3.6. Inhibition studies with selective COX-1 and COX-2 inhibitors

To evaluate the relative contribution of COX-1 and COX-2 in the synthesis of PGI<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub> in aortic tissue, an additional experiment was performed to assess the effect of an acute treatment with selective COX-1 and COX-2 inhibitors in rats. The rat was selected as the species for these experiments since conditions for selective inhibition of COX-1 with SC-560 at 10 mg/kg [31] and of COX-2 with MF tricyclic at 5 mg/kg [33] have been established. Administration of the COX-1 inhibitor SC-560 to naïve rats resulted in a significant decrease of aortic tissue levels of both 6-keto-PGF<sub>1α</sub> ( $63 \pm 13\%$ ) and TXB<sub>2</sub> ( $77 \pm 5\%$ ), the stable breakdown products of PGI<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub>, respectively. In contrast, treatment with the selective COX-2 inhibitor MF tricyclic, at a dose 2- to 5-fold higher than its efficacious anti-inflammatory dose, did not significantly affect the levels of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and TXB<sub>2</sub> (Fig. 8).

Double immunolabeling experiments were also performed on frozen sections of rat aortas to compare the expression patterns of COX-1/PGIS and COX-2/PGIS with those observed in canine and human vessels. Intense COX-1 staining was consistently observed and was coincident with PGIS labeling in the endothelium and the media (Fig. 9A-C). COX-2 expression was not detectable in most cryosections of rat aorta (Fig. 9D-F), although a few minor COX-2 foci were occasionally detected (Fig. 9G-I), as observed for the dog aorta. In contrast, robust COX-2 labeling was readily demonstrable in the rat kidney macula densa (Fig. 9J) examined in parallel as a positive control.

#### 4. Discussion

Earlier studies performed before the discovery of COX-2 have shown that cyclooxygenase is highly expressed in the endothelium of various animal species at >20-fold higher levels than in the medial layer both by activity and immunolabeling [39]. In aortic and carotid vessels, we found that COX-1 is widely expressed along the endothelium. Quantification of the immunolabeling in the dog tissue indicated that 55% of the aortic endothelium exhibited COX-1 expression, as compared to 8% for COX-2. In previous studies with various animal tissues, COX-2 expression has been characterized in major blood vessels after angioplasty [26], aneurism [40] or induction of atherosclerotic lesions [23,41] but found to be minimally expressed or undetectable in healthy tissues [23,25,26,41-45]. Similarly, in humans, COX-2 has been reported to be expressed in atherosclerotic plaques [22,24,46,47], mostly in macrophages and foamy cells but also in the microvascular endothelium in plaques [22], and in endothelial cells of the vasa vasorum [24]. Endothelial cells of umbilical arteries have been shown to express COX-2 by in situ COX-2 RNA labeling [48]. COX-2 expression has been found to be elevated in endothelial cells and other cell types in atrial appendages after ischemia but was barely detectable in arteriolar endothelial cells before ischemia [49]. Conflicting data have been reported for the vasa vasorum of mammary and saphenous veins [9,50]. In histologically normal coronary arteries [24] and in non-atheromatous aorta [22,49,51], undetectable or little COX-2 protein immunostaining was observed, as in the present study.

In several cellular models, it has been proposed that PGIS preferentially couples with COX-2 for the production of PGI<sub>2</sub> [11,12,52]. Our data indicate that PGIS co-localizes mainly with COX-1 in aortic endothelium of three different species. In dog, only 3% of the endothelium exhibited COX-2/PGIS co-expression, compared to 19% for COX-1. The pattern of COX-2 and PGIS co-expression in regions of elevated shear stress was low and similar to that of the un-branched aortic endothelium. Surprisingly, the 6-fold higher co-localization of PGIS with COX-1 reflects our observation of a 6-fold greater COX-1 expression compared to COX-2, suggesting that endothelial cells expressing COX-2 do not preferentially express PGIS. The present data are not in line with the clinical studies indicating that selective COX-2 inhibitors block the excretion of urinary PGI<sub>2</sub> metabolites [15-17]. It is possible that COX-2 is expressed in vascular beds other than those examined here or, alternatively, that COX-2 from other tissues, such as kidney [35,36] or the lung [37,38] contributes to the generation of the urinary prostacyclin metabolites. It should be noted that protein immunolabeling might not necessarily reflect the status of active COX since COX-2 has been shown to have a lower threshold for hydroperoxide activation and utilization of cellular endogenous arachidonic acid substrate [53,54]. It is thus possible that endothelial COX-2, under conditions of laminar blood flow [8] or other mechanisms of sustained activation, provides a more important contribution to systemic prostacyclin synthesis than suggested by the amount of co-localization with PGIS. We have not performed the quantitative analysis for TXS, but our double-labeled micrographs of aortic endothelium indicate that the levels of COX-1/TXS coincidence far exceed those of COX-2/TXS. Studies with cultured cells have shown that TXS, in addition to PGIS, can be up-

regulated with COX-2 in response to shear stress [10] and that COX-2 can be up-regulated by thromboxane [55]. The present immunolabeling data suggest that COX-2 could play a role in localized production of both PGI<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub>. Further work is needed to define the role that the individual COX-2 derived prostanoids might play in vasculature. Unfortunately, inconsistent data have been obtained with the genetic deletion of COX-2 in bone marrow-derived cells causing a reduction of atherosclerosis [41,56], and pharmacological inhibition of COX-2 either reducing [41,56], promoting [57] or having little effect [58,59] in models of atherogenesis [60,61].

It is of interest that a significant proportion of PGIS was not co-localized with either COX-1 or COX-2, representing about half of the PGIS and 20% of the endothelium in the dog. The relatively large number of endothelial cells expressing PGIS without co-localized COX suggests that transcellular transport of PGH<sub>2</sub> between endothelial cells might be involved in the synthesis of PGI<sub>2</sub> in the endothelium. Evidence for the redirection of the COX product from the TX to the PGI<sub>2</sub> pathway has been previously observed following treatment with anti-TX agents [62,63].

The co-localization of PGIS and COX-2 was also examined in the lung, since this tissue expresses COX-2 and has a high capacity to produce PGI<sub>2</sub> [37,38]. Using a methodology similar to that used for the aortic endothelium, COX-2 and PGIS were found to co-localize throughout the dog bronchiolar epithelium. Evidence of a functional role for COX-2 in this tissue is suggested by experiments showing that the COX-2 inhibitor NS-398 inhibits PGI<sub>2</sub> generation and affects vascular tone in non-

inflamed rat lungs [37]. The extensive co-localization of COX-2 with PGIS in the lung also suggests that this tissue could represent a rich source of COX-2 mediated PGI<sub>2</sub> production.

The present pharmacological data indicate that selective inhibition of COX-1, and not of COX-2, caused a decrease in rat aortic tissue levels of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and TXB<sub>2</sub> (using whole tissue extracts containing the medial layer in addition to the endothelium). Other evidences of a functional role for endothelial COX-1 in the production of PGI<sub>2</sub> have been obtained in models of coronary vasodilation induced by arachidonic acid in dogs [64] and noradrenaline-induced contraction in rat coronary artery [65] and of arachidonic acid-stimulated PGI<sub>2</sub> synthesis in rabbit atherosclerotic aortic tissue [23]. In healthy volunteers, assessment of the inhibition of prostanoid formation also showed that the selective COX-2 inhibitor rofecoxib does not affect PGI<sub>2</sub> formation at a site of microvascular injury, in contrast to the nonselective naproxen [66]. Alteration of the PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> ratio through deletion of the IP receptor in mice has been used as a model to define the consequences of the inhibitory effects of COX-2 inhibitors on vascular PGI<sub>2</sub> synthesis. Deletion of the IP receptor in mice has been shown to promote carotid intimal hyperplasia in response to injury [1] and to increase the severity of aortic lesions in models of atherogenesis [2], effects which are abolished by co-deletion of the TP receptor. In light of the present results, it is clear that the contribution of COX-1 mediated PGI<sub>2</sub> synthesis in vascular tissue, in addition to that of COX-2, must be considered when interpreting the effects of IP receptor deletion. In agreement with this proposed role for vascular COX-1, selective COX-1 inhibition, and not COX-2

inhibition, was shown to reduce the vascular intimal hyperplasia in a model of carotid artery angioplasty injury in rats [26]. The present data show a predominant role for COX-1 in the production of prostanoids in normal aortic endothelium, and also suggests that a complex relationship exists between the COX isoforms and the terminal synthases for the regulation of TXA<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> synthesis in the vascular endothelium.

## **Acknowledgements**

We are grateful to P. K. Cunningham, D. F. Hora Jr, G. M. Seeburger, and A. S. Parlapiano of the Department of Comparative Medicine (Merck, Rahway, NJ) for performing the dog necropsies, to D. Normandin and S. Wong of the Department of Comparative Medicine (Merck Frosst) for performing the rat necropsies, and to M. D. Percival, J. Evans and P. Detmers for critical reading of the manuscript. This work was supported in part by studentships from NSERC and from the Department of Biochemistry, Université de Montréal, to P.-O. H.



**References**

- [1] Y. Cheng, S.C. Austin, B. Rocca, B.H. Koller, T.M. Coffman, T. Grosser, J.A. Lawson, G.A. FitzGerald, Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>, *Science* 296 (2002) 539-541.
- [2] T. Kobayashi, Y. Tahara, M. Matsumoto, M. Iguchi, H. Sano, T. Murayama, H. Arai, H. Oida, T. Yurugi-Kobayashi, J.K. Yamashita, H. Katagiri, M. Majima, M. Yokode, T. Kita, S. Narumiya, Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 784-794.
- [3] G.A. FitzGerald, Coxibs and cardiovascular disease, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1709-1711.
- [4] J.Y. Liou, S.K. Shyue, M.J. Tsai, C.L. Chung, K.Y. Chu, K.K. Wu, Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 15314-15320.
- [5] G.E. Caughey, L.G. Cleland, P.S. Penglis, J.R. Gamble, M.J. James, Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2, *J. Immunol.* 167 (2001) 2831-2838.

- [6] M. Bustos, T.M. Coffman, S. Saadi, J.L. Platt, Modulation of eicosanoid metabolism in endothelial cells in a xenograft model. Role of cyclooxygenase-2, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 1150-1158.
- [7] L.H. Smith, O. Boutaud, M. Breyer, J.D. Morrow, J.A. Oates, D.E. Vaughan, Cyclooxygenase-2-dependent prostacyclin formation is regulated by low density lipoprotein cholesterol in vitro, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 983-988.
- [8] J.N. Topper, J. Cai, D. Falb, M.A. Gimbrone, Jr., Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 10417-10422.
- [9] D. Bishop-Bailey, J.R. Pepper, E.B. Haddad, R. Newton, S.W. Larkin, J.A. Mitchell, Induction of cyclooxygenase-2 in human saphenous vein and internal mammary artery, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997) 1644-1648.
- [10] R. Doroudi, L.M. Gan, S.L. Selin, S. Jern, Effects of shear stress on eicosanoid gene expression and metabolite production in vascular endothelium as studied in a novel biomechanical perfusion model, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 (2000) 257-264.

- [11] N. Ueno, M. Murakami, T. Tanioka, K. Fujimori, T. Tanabe, Y. Urade, I. Kudo, Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 34918-34927.
- [12] G.D. Norata, E. Callegari, H. Inoue, A.L. Catapano, HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 871-877.
- [13] K. Okahara, B. Sun, J. Kambayashi, Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (1998) 1922-1926.
- [14] R. Doroudi, L.M. Gan, L.S. Sjogren, S. Jern, Intraluminal pressure modulates eicosanoid enzyme expression in vascular endothelium of intact human conduit vessels at physiological levels of shear stress, *J. Hypertens.* 20 (2002) 63-70.
- [15] B.F. McAdam, F. Catella-Lawson, I.A. Mardini, S. Kapoor, J.A. Lawson, G.A. FitzGerald, Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 272-277.
- [16] L. Cullen, L. Kelly, S.O. Connor, D.J. Fitzgerald, Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287 (1998) 578-582.
- [17] F. Catella-Lawson, B. McAdam, B.W. Morrison, S. Kapoor, D. Kujubu, L. Antes, K.C. Lasseter, H. Quan, B.J. Gertz, G.A. FitzGerald, Effects of specific

- inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289 (1999) 735-741.
- [18] I. Siegle, R. Nusing, R. Brugger, R. Sprenger, R. Zecher, V. Ullrich, Characterization of monoclonal antibodies generated against bovine and porcine prostacyclin synthase and quantitation of bovine prostacyclin synthase, *FEBS Lett.* 347 (1994) 221-225.
- [19] Y. Tone, H. Inoue, S. Hara, C. Yokoyama, T. Hatae, H. Oida, S. Narumiya, R. Shigemoto, S. Yukawa, T. Tanabe, The regional distribution and cellular localization of mRNA encoding rat prostacyclin synthase, *Eur. J. Cell Biol.* 72 (1997) 268-277.
- [20] W.L. Smith, D.L. DeWitt, R.M. Garavito, Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 145-182.
- [21] G.A. FitzGerald, COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 879-890.
- [22] U. Schonbeck, G.K. Sukhova, P. Graber, S. Coulter, P. Libby, Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions, *Am. J. Pathol.* 155 (1999) 1281-1291.
- [23] E. Wong, J.Q. Huang, P. Tagari, D. Riendeau, Effects of COX-2 inhibitors on aortic prostacyclin production in cholesterol-fed rabbits, *Atherosclerosis* 157 (2001) 393-402.

- [24] C.S. Baker, R.J. Hall, T.J. Evans, A. Pomerance, J. Maclouf, C. Creminon, M.H. Yacoub, J.M. Polak, Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 646-655.
- [25] K.A. Pritchard, Jr., M.K. O'Banion, J.M. Miano, N. Vlasic, U.G. Bhatia, D.A. Young, M.B. Stemerman, Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 8504-8509.
- [26] E. Connolly, D.J. Bouchier-Hayes, E. Kaye, A. Leahy, D. Fitzgerald, O. Belton, Cyclooxygenase isozyme expression and intimal hyperplasia in a rat model of balloon angioplasty, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300 (2002) 393-398.
- [27] T.D. Warner, I. Vojnovic, F. Giuliano, R. Jimenez, D. Bishop-Bailey, J.A. Mitchell, Cyclooxygenases 1, 2, and 3 and the production of prostaglandin I<sub>2</sub>: investigating the activities of acetaminophen and cyclooxygenase-2-selective inhibitors in rat tissues, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310 (2004) 642-647.
- [28] Z. Qi, H. Cai, J.D. Morrow, M.D. Breyer, Differentiation of cyclooxygenase 1- and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta, *Hypertension* 48 (2006) 323-328.
- [29] J.A. Mitchell and T.D. Warner, COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 75-86.

- [30] I.I. Singer, D.W. Kawka, S. Schloemann, T. Tessner, T. Riehl, W.F. Stenson, Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 115 (1998) 297-306.
- [31] C.J. Smith, Y. Zhang, C.M. Koboldt, J. Muhammad, B.S. Zweifel, A. Shaffer, J.J. Talley, J.L. Masferrer, K. Seibert, P.C. Isakson, Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation, *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 95 (1998) 13313-13318.
- [32] M. Oshima, J.E. Dinchuk, S.L. Kargman, H. Oshima, B. Hancock, E. Kwong, J.M. Trzaskos, J.F. Evans, M.M. Taketo, Suppression of intestinal polyposis in *Apc delta716* knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2), *Cell* 87 (1996) 803-809.
- [33] P.O. Hetu and D. Riendeau, Cyclo-oxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain, *Biochem. J.* 391 (2005) 561-566.
- [34] M.D. Percival, M. Ouellet, C.J. Vincent, J.A. Yergey, B.P. Kennedy, G.P. O'Neill, Purification and characterization of recombinant human cyclooxygenase-2, *Arch. Biochem. Biophys.* 315 (1994) 111-118.
- [35] R.C. Harris, J.A. McKanna, Y. Akai, H.R. Jacobson, R.N. Dubois, M.D. Breyer, Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 2504-2510.
- [36] K.N. Khan, C.M. Venturini, R.T. Bunch, J.A. Brassard, A.T. Koki, D.L. Morris, B.F. Trump, T.J. Maziasz, C.L. Alden, Interspecies differences in renal

- localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity, *Toxicol. Pathol.* 26 (1998) 612-620.
- [37] L. Ermert, M. Ermert, A. Althoff, M. Merkle, F. Grimminger, W. Seeger, Vasoregulatory prostanoid generation proceeds via cyclooxygenase-2 in noninflamed rat lungs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286 (1998) 1309-1314.
- [38] L. Ermert, M. Ermert, M. Goppelt-Struebe, D. Walmrath, F. Grimminger, W. Steudel, H.A. Ghofrani, C. Homberger, H. Duncker, W. Seeger, Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18 (1998) 479-488.
- [39] D.L. DeWitt, J.S. Day, W.K. Sonnenburg, W.L. Smith, Concentrations of prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin I<sub>2</sub> synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta, *J. Clin. Invest.* 72 (1983) 1882-1888.
- [40] D.R. Holmes, W. Wester, R.W. Thompson, J.M. Reilly, Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms, *J. Vasc. Surg.* 25 (1997) 810-815.
- [41] M.E. Burleigh, V.R. Babaev, J.A. Oates, R.C. Harris, S. Gautam, D. Riendeau, L.J. Marnett, J.D. Morrow, S. Fazio, M.F. Linton, Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice, *Circulation* 105 (2002) 1816-1823.

- [42] D. Henrion, E. Dechaux, F.J. Dowell, J. Maclour, J.L. Samuel, B.I. Levy, J.B. Michel, Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclooxygenase-2, *Br. J. Pharmacol.* 121 (1997) 83-90.
- [43] D.A. Habermehl, M.A. Janowiak, K.E. Vagnoni, I.M. Bird, R.R. Magness, Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. IV. Cyclooxygenase isoform expression during the ovarian cycle and pregnancy in sheep, *Biol. Reprod.* 62 (2000) 781-788.
- [44] M.A. Hernandez-Presa, J.L. Martin-Ventura, M. Ortego, A. Gomez-Hernandez, J. Tunon, P. Hernandez-Vargas, L.M. Blanco-Colio, S. Mas, C. Aparicio, L. Ortega, F. Vivanco, J.G. Gerique, C. Diaz, G. Hernandez, J. Egido, Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells, *Atherosclerosis* 160 (2002) 49-58.
- [45] K.M. Stanfield, K.N. Khan, M.R. Gralinski, Localization of cyclooxygenase isozymes in cardiovascular tissues of dogs treated with naproxen, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 80 (2001) 309-314.
- [46] O. Belton, D. Byrne, D. Kearney, A. Leahy, D.J. Fitzgerald, Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis, *Circulation* 102 (2000) 840-845.
- [47] F. Cipollone, C. Prontera, B. Pini, M. Marini, M. Fazio, D. De Cesare, A. Iezzi, S. Uchino, G. Boccoli, V. Saba, F. Chiarelli, F. Cuccurullo, A. Mezzetti,



Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability, *Circulation* 104 (2001) 921-927.

- [48] T. Grosser, S. Fries, G.A. FitzGerald, Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 4-15.
- [49] C. Metais, C. Bianchi, J. Li, J. Li, M. Simons, F.W. Sellke, Serotonin-induced human coronary microvascular contraction during acute myocardial ischemia is blocked by COX-2 inhibition, *Basic Res. Cardiol.* 96 (2001) 59-67.
- [50] V. Stemme, J. Swedenborg, H. Claesson, G.K. Hansson, Expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 20 (2000) 146-152.
- [51] B.K. Hong, H.M. Kwon, B.K. Lee, D. Kim, I.J. Kim, S.M. Kang, Y. Jang, S.H. Cho, H.K. Kim, B.C. Jang, S.Y. Cho, H.S. Kim, M.S. Kim, H.C. Kwon, N. Lee, Coexpression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases in human aortic atherosclerotic lesions, *Yonsei Med. J.* 41 (2000) 82-88.
- [52] T.G. Brock, R.W. McNish, M. Peters-Golden, Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 11660-11666.

- [53] R.J. Kulmacz and L.H. Wang, Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24019-24023.
- [54] W.L. Smith, R.M. Garavito, D.L. DeWitt, Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 33157-33160.
- [55] G.E. Caughey, L.G. Cleland, J.R. Gamble, M.J. James, Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets. Role of thromboxane A<sub>2</sub>, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 37839-37845.
- [56] M.E. Burleigh, V.R. Babaev, P.G. Yancey, A.S. Major, J.L. McCaleb, J.A. Oates, J.D. Morrow, S. Fazio, M.F. Linton, Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (2005) 443-452.
- [57] D. Rott, J. Zhu, M.S. Burnett, Y.F. Zhou, A. Zalles-Ganley, J. Ogunmakinwa, S.E. Epstein, Effects of MF-tricyclic, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on atherosclerosis progression and susceptibility to cytomegalovirus replication in apolipoprotein-E knockout mice, *J. Am. Coll. Cardiol.* 41 (2003) 1812-1819.
- [58] D. Pratico, C. Tillmann, Z.B. Zhang, H. Li, G.A. FitzGerald, Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 3358-3363.

- [59] O.A. Belton, A. Duffy, S. Toomey, D.J. Fitzgerald, Cyclooxygenase isoforms and platelet vessel wall interactions in the apolipoprotein E knockout mouse model of atherosclerosis, *Circulation* 108 (2003) 3017-3023.
- [60] M.F. Linton and S. Fazio, Cyclooxygenase-2 and atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.* 13 (2002) 497-504.
- [61] G.J. Hankey and J.W. Eikelboom, Cyclooxygenase-2 inhibitors: are they really atherothrombotic, and if not, why not?, *Stroke* 34 (2003) 2736-2740.
- [62] J. Nowak and G.A. FitzGerald, Redirection of prostaglandin endoperoxide metabolism at the platelet-vascular interface in man, *J. Clin. Invest.* 83 (1989) 380-385.
- [63] C. Buccellati, P. Ciceri, R. Ballerio, C. Casagrande, G. Folco, S. Nicosia, Evaluation of the effects of anti-thromboxane agents in platelet-vessel wall interaction, *Eur. J. Pharmacol.* 443 (2002) 133-141.
- [64] G.J. Gross and J. Moore, Effect of COX-1/COX-2 Inhibition versus Selective COX-2 Inhibition on Coronary Vasodilator Responses to Arachidonic Acid and Acetylcholine, *Pharmacology* 71 (2004) 135-142.
- [65] A. Wang, T. Nishihashi, C.C. Trandafir, S. Murakami, X. Ji, Y. Shimizu, K. Kurahashi, Involvement of endothelial cyclo-oxygenase metabolites in noradrenaline-induced contraction of rat coronary artery, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32 (2005) 628-632.

- [66] E. Tuleja, F. Mejza, A. Cmiel, A. Szczeklik, Effects of cyclooxygenases inhibitors on vasoactive prostanoids and thrombin generation at the site of microvascular injury in healthy men, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1111-1115.

## Figure legends

**Fig. 1.** Double-label immunofluorescence microscopy of COX-1, COX-2 and PGIS in a dog aorta. (A-C) Corresponding views of a single aortic cryosection depicting expression of COX-1 (A, red fluorescence), PGIS (B, green fluorescence), and co-expression of COX-1 and PGIS (C). Arrowheads delineate the same endothelial area; regions of coincident COX-1 and PGIS labeling appear yellow. COX-1 and PGIS are co-localized in much of the endothelial field shown. (D-F) illustrate lack of COX-2 expression (D, red fluorescence) characteristic of the majority of the aortic endothelium, and the corresponding expression of PGIS (E, green fluorescence alone; F, red and green fluorescence). (G-I) Micrographs of a single aortic cryosection in an area selected for its expression of COX-2, showing COX-2 (G, red fluorescence), PGIS (H, green fluorescence), and COX-2 plus PGIS (I). Corresponding arrowheads indicate small isolated foci of COX-2 and PGIS co-distribution. Bar = 20  $\mu$ m.

**Fig. 2.** Immunoblotting of COX-2 in LPS-stimulated dog peripheral blood mononuclear cells. Microsomal fractions (8.5  $\mu$ g protein) from LPS- or vehicle-treated dog mononuclear cells were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted for COX-2 and cyclophilin B. Purified human COX-2 (1 ng) was used as control. The two proteins were consecutively detected on the same blot by stripping the membrane before the second immunoblot for cyclophilin B.

**Fig. 3.** Dual labeling of the carotid artery endothelium at the aortic branch-point. Minor foci of COX-2 labeling show mostly non-overlapping PGIS expression and minimal co-localization. (A-C) Corresponding views of a single cryosection from a 5 year old beagle showing immunofluorescence labeling of COX-2 (A, red fluorescence), PGIS (B, green fluorescence), and dual labeling of COX-2 plus PGIS either without (C) or with DAPI counterstaining (D, blue). Arrowheads depict adjacent foci of COX-2 and PGIS expression; most of the COX-2 and PGIS staining does not co-localize. Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 4.** TXS is widely co-expressed with COX-1 and co-localizes with small foci of COX-2 in dog aortic endothelium. (A-C) Immunofluorescence labeling of COX-1 (A, red fluorescence), TXS (B, green fluorescence) and co-expression of COX-1 and TXS within a single aortic cryosection (C). COX-1 and TXS are co-distributed (arrowheads) throughout the entire endothelial field shown. (D-F) Staining of COX-2 (D, red fluorescence) and TXS (E, green fluorescence) shown individually, or combined (F), obtained from one aortic cryosection. Regions of coincident COX-1 or COX-2 and TXS labeling appear yellow; matching arrowheads depict minor COX-2 foci coincident with TXS labeling (F). Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 5.** Quantification of COX-1, COX-2, and PGIS in normal canine aortic endothelium. (A) Expression of COX-1, PGIS and COX-1 co-localized with PGIS calculated as a percentage of the mean total endothelial length (185,321  $\mu\text{m}$ ) of two complete aortic cross-sections per dog ( $n=6 \pm \text{S.E.M.}$ ). (B) Immunolabeling of COX-2,

PGIS and COX-2 co-localized with PGIS performed on adjacent aortic cross-sections and quantitated as a percentage of a mean total endothelial length (196,206  $\mu\text{m}$ ) as indicated in (A).

**Fig. 6.** Expression of COX-2 and PGIS in the dog lung. (A) Frozen section from a dog lung labeled for COX-2 by immunoperoxidase microscopy. Intense COX-2 staining (black reaction product) is uniformly distributed throughout the bronchiolar epithelium (arrowheads); section counterstained with eosin. (B-D) Double-label immunofluorescence microscopy of COX-2 and PGIS expression in the bronchiolar epithelium. COX-2 labeling (B, red fluorescence) is concentrated near the luminal surface of the epithelium (arrowheads) where it is co-localized with PGIS staining (C, green fluorescence, corresponding arrowheads). Co-localization of both COX-2 and PGIS labeling in the bronchiolar epithelium is shown (D, yellow) with DAPI counterstaining (D, blue). Bars: (A) = 500  $\mu\text{m}$ ; (B-D) = 20  $\mu\text{m}$ .

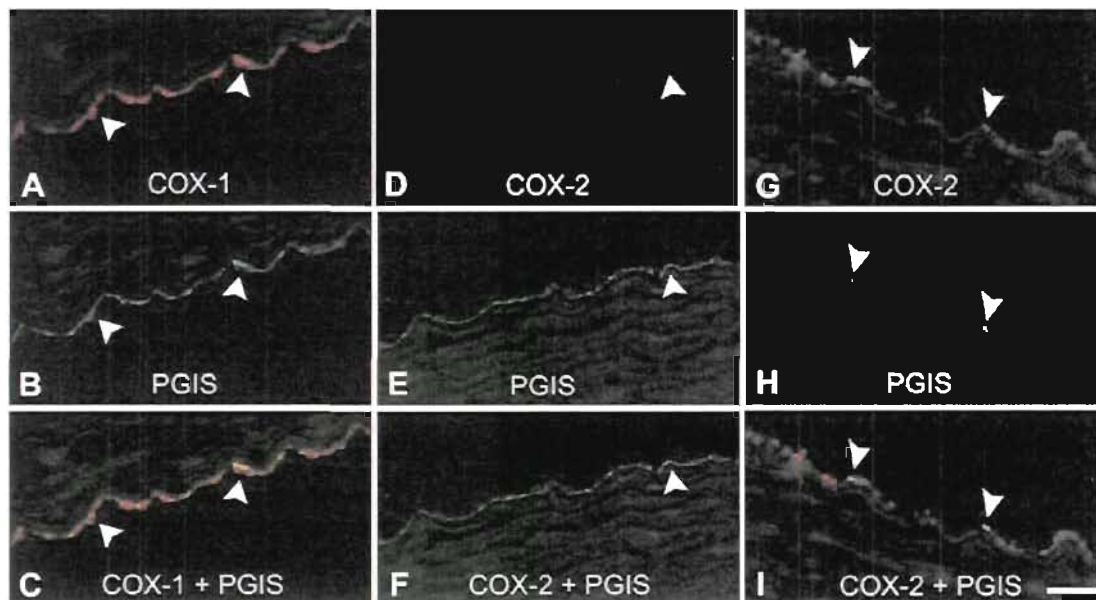
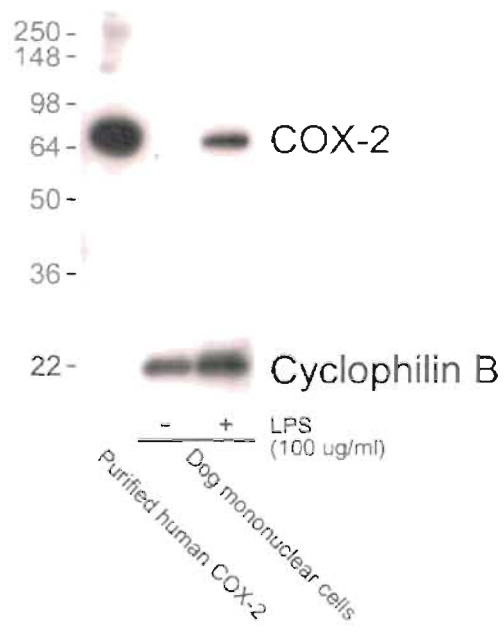
**Fig. 7.** Dual-immunostaining of COX-1, COX-2 and PGIS in human aorta and IBD colon. (A-C) Multiple views of the same aortic region illustrating expression of COX-1 (A, red), PGIS (B, green), and their co-distribution (C). Arrowheads delineate the same endothelial locus. (D-F) Serial micrographs show no detectable COX-2 expression (D, red) in PGIS+ foci (E arrowheads, green alone; F arrowheads, red and green). (G-I) Matching micrographs of human IBD colon show abundant COX-2 expression in the colitic epithelium (G,I red, arrowheads), in leukocytes of the inflamed gut lumen (G,I insets), and lamina propria (G,I red, short arrows). Clusters of COX-2-positive

leukocytes also express PGIS (H,I insets), while other PGIS+ cells lack COX-2 (long arrows). Bar = 10  $\mu$ m.

**Fig. 8.** Effect of selective inhibitors of COX-1 and COX-2 on the levels of 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  and TXB<sub>2</sub> in rat aortic tissue. Male Sprague-Dawley rats (n=10/group) were administered either a selective COX-1 inhibitor (SC-560, 10 mg/kg), a selective COX-2 inhibitor (MF tricyclic, 5 mg/kg), or vehicle (0.5% methylcellulose) for 4 h. Aortic tissue was processed for quantification of the levels of 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  and TXB<sub>2</sub> by mass spectrometry. Data reported as geometric means  $\pm$  S.E.M. (\*,  $P < 0.05$ ).

**Fig. 9.** Double-labeling of COX-1, COX-2 and PGIS in the rat aorta and kidney. (A-C) Corresponding micrographs of a single aortic section showing expression of COX-1 (A, red fluorescence), PGIS (B, green fluorescence), and their co-localization (C, yellow fluorescence). Arrowheads depict co-localization of COX-1 and PGIS in an identical endothelial region. (D-F) illustrate the lack of COX-2 expression (D, red fluorescence) in the endothelium (arrow), and the matching PGIS staining (E & F, green fluorescence). (G-H) Another aortic region illustrating a rare minor focus of COX-2 expression in the endothelium (G, arrowhead, red fluorescence) that is coincident with PGIS labeling (H & I, arrowheads). (J) Rat renal cortex depicting intense COX-2 expression in the macula densa (arrowheads, red fluorescence), and PGIS labeling of glomerular endothelial cells (arrows, green fluorescence). Bar = 10  $\mu$ m.



**Figure 1****Figure 2**

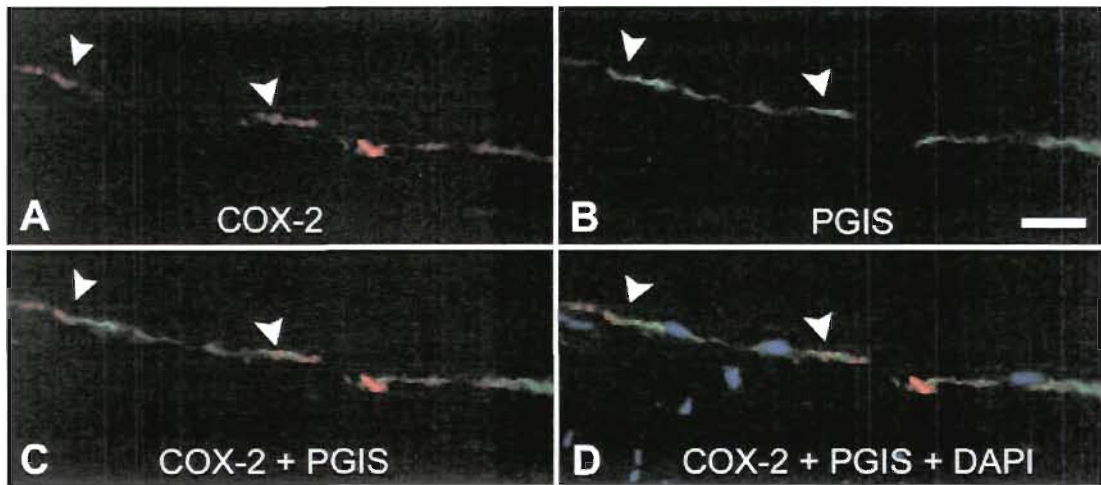
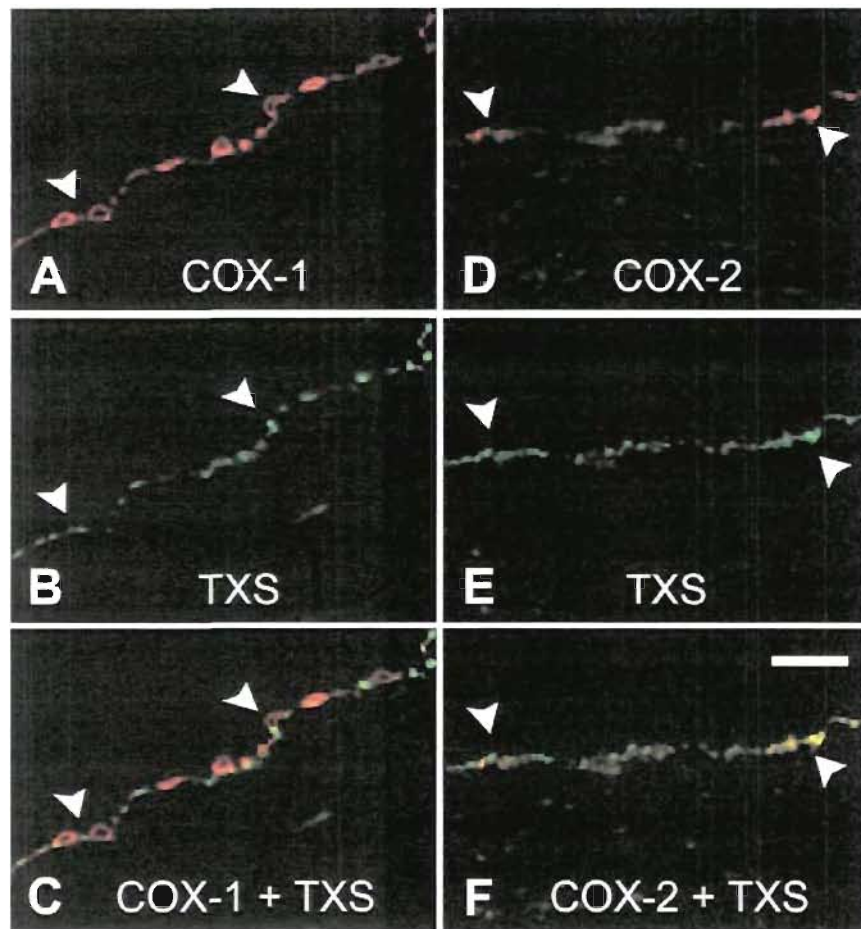
**Figure 3****Figure 4**

Figure 5

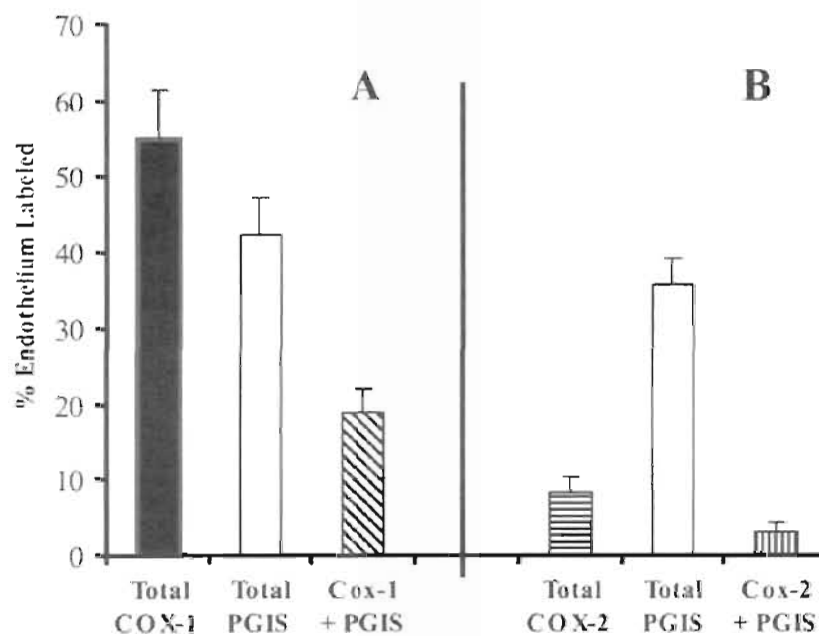


Figure 6

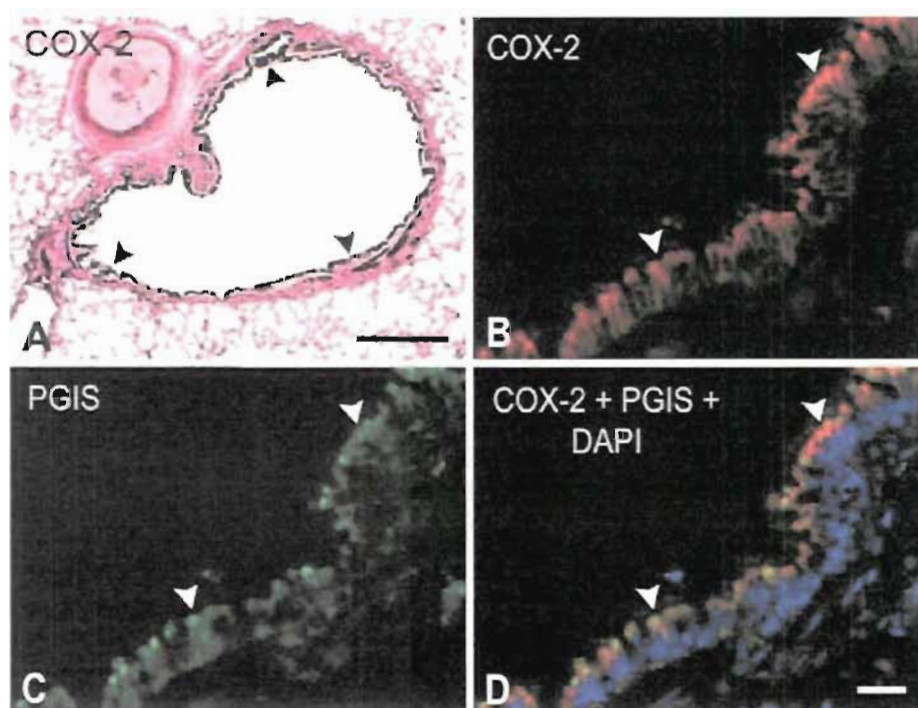


Figure 7

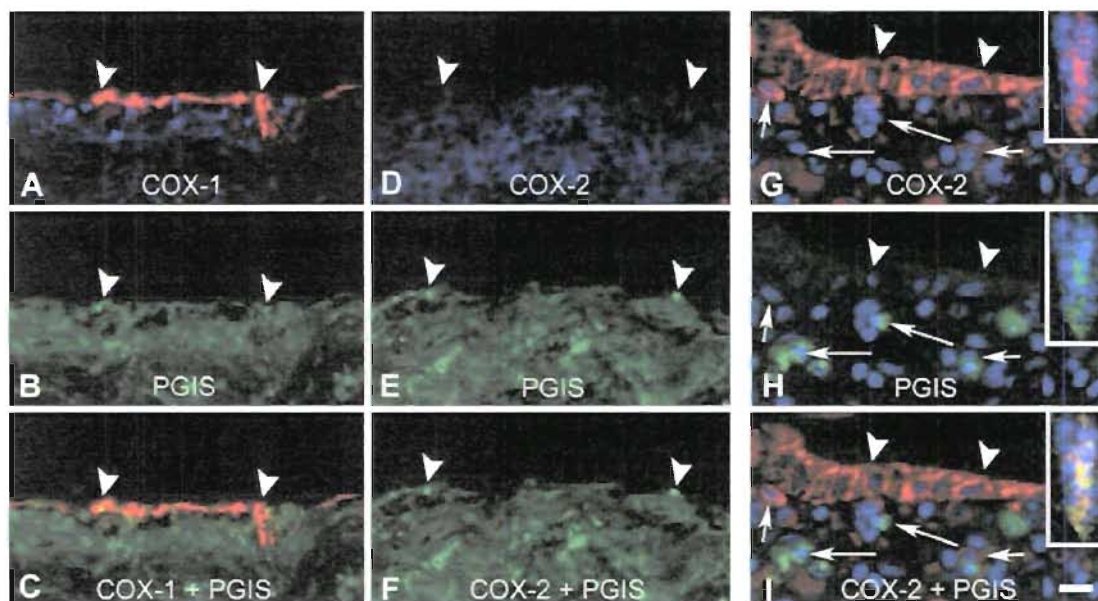
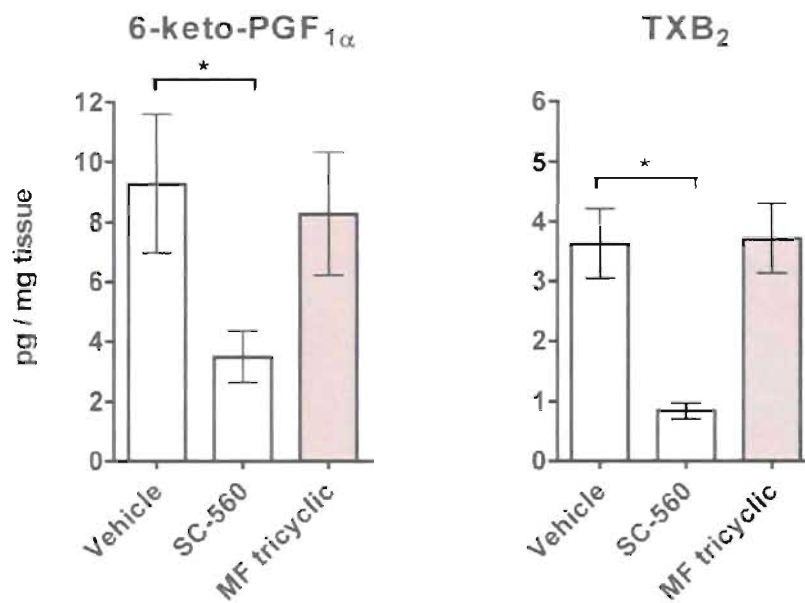
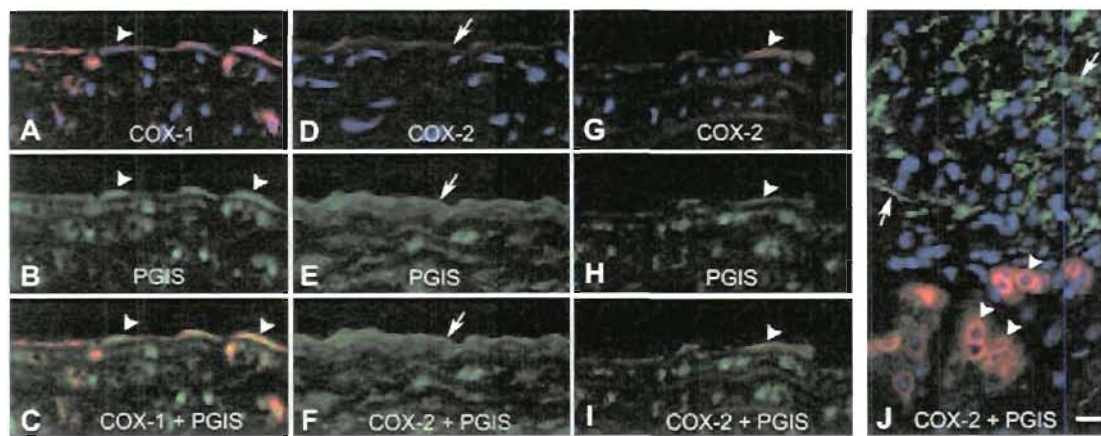


Figure 8



**Figure 9**

**CHAPITRE 8.**

**Cyclooxygenase-2 Contributes to Constitutive Prostanoid Production  
in Rat Kidney and Brain**

Hétu, P.O. et Riendeau, D. (2005) *Biochem. J.*, **391**:561-566.

**Contribution des auteurs:**

Pierre-Olivier Hétu: Expérimentation, analyse des résultats et rédaction du manuscrit.

Denis Riendeau: Supervision générale du projet et rédaction du manuscrit.

## **Cyclooxygenase-2 Contributes to Constitutive Prostanoid Production in Rat Kidney and Brain**

**Pierre-Olivier Héту and Denis Riendeau<sup>1</sup>**

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Kirkland (Québec) H9H 3L1, Canada.

<sup>1</sup> **Corresponding author.** Department of Biochemistry and Molecular Biology, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, 16711 Trans-Canada Highway, Kirkland (Qc) H9H 3L1, Canada. Tel: 514-428-2673. Fax: 514-428-4930. E-mail:

████████████████████

**Running title:** Cyclooxygenase-2 mediated prostanoid synthesis in brain and kidney

**Keywords:** Kidney, Brain, Prostaglandins, Thromboxanes, Cyclooxygenases, COX-2 inhibitors

**Abbreviations used:** NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; COX, cyclooxygenase; PG, prostaglandin; TX, thromboxane; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry; DTT, dithiothreitol; S.E.M., standard error of the mean; SC-560, 5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-trifluoromethylpyrazole; MF tricyclic, 3-(3,4-difluorophenyl)-4-(4-(methylsulfonyl)phenyl)-2-(5H)-furanone; DFU, 5,5-dimethyl-3-(3-fluorophenyl)-4-(4-methylsulphonyl) phenyl-2(5H)-furanone; LPS, lipopolysaccharide.

**ABSTRACT**

Cyclooxygenases (COX) catalyze the synthesis of prostaglandin (PG)<sub>H2</sub> which serves as the common substrate for the production of PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), and thromboxanes (TX). While COX-1 is the major isoform responsible for prostanoid synthesis in healthy tissue, little information is available on the contribution of constitutive COX-2 to the various prostanoid synthetic pathways under non-inflammatory conditions. To further evaluate the role of COX-2 in prostanoid biosynthesis, rats were acutely treated with the selective COX-1 inhibitor SC-560 or the selective COX-2 inhibitors MF tricyclic and DFU. Selected tissues were then processed for a complete analysis of their prostanoid content by LC-MS. Whereas the treatment with SC-560 caused a 60-70% inhibition in the total prostanoid content of most tissues examined, a significant decrease (35-50%) in total prostanoid content following selective COX-2 inhibition was solely detected for kidney and brain tissues. Analysis of the individual prostanoids reveals significant inhibition of 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, and TXB<sub>2</sub> in the kidney and of all these prostanoids with the exception of PGD<sub>2</sub> in the forebrain. These data demonstrate that constitutively expressed COX-2 contributes to the production of prostanoids in kidney and brain for each of the PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, and TXB<sub>2</sub> pathways under non-inflammatory conditions. Approaches to modulate inflammation through specific inhibition of terminal synthases, such as microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 (mPGES-1), thus have the potential to differ from COX-2 inhibitors and non-selective NSAIDs with regard to effects on constitutive prostanoid synthesis and on renal function.



## INTRODUCTION

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) exert their effects by inhibiting the enzyme cyclooxygenase (COX) [1], of which two major isoforms exist (COX-1 and COX-2). Most, if not all of the efficacy of NSAIDs as anti-inflammatory agents are due to inhibition of COX-2 [2]. The COX-2 enzyme is generally undetectable or present at low levels in resting state but is induced by various stimuli like bacterial endotoxins, inflammatory cytokines, and growth factors, as opposed to COX-1, which is constitutively expressed in the majority of tissues [3]. These enzymes catalyze the first step in the conversion of arachidonic acid to prostanoids, including prostaglandins (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, and PGF<sub>2α</sub>) and thromboxanes (TXA<sub>2</sub>) [4]. Prostanoids are a family of paracrine and autocrine mediators that possess multiple biological functions [5]. For example, PGE<sub>2</sub> is implicated in maintenance of gastrointestinal integrity, in fever generation, in allodynia and hyperalgesia, as well as in inflammation [6].

Although it is mainly induced by pro-inflammatory stimuli, COX-2 has been found to be constitutively expressed in some tissues including brain [7], kidney [8], lung [9], and reproductive organs [10]. Particularly, in the central nervous system, COX-2 has been detected predominately in cortex, hypothalamus, hippocampus, amygdala, and spinal chord [7,11]. The role of the constitutive COX-2 in the brain has not been defined, but it is speculated to play a role in nerve transmission, as COX-2 expression is up-regulated by nerve activity [12,13]. Also, COX-2 is induced in the brain following inflammatory stimuli and it is implicated in fever generation and hyperalgesia [12]. As for the kidney, COX-2 protein expression has been detected in the macula densa and associated cortical thick ascending limb of Henle's loop, in medullary interstitial cells,

and to a lower level in the inner medullary collecting duct [8,14,15]. COX-2 is thought to play a role in regulation of renal perfusion, since high salt diets induce COX-2 expression in renal medulla [14], as well as in salt and water excretion since low salt diet or loop diuretics increase COX-2 cortical expression in the macula densa [16,17]. Moreover, selective COX-2 inhibitors and NSAIDs tend to cause acute salt and water retention in healthy subjects [18].

Cyclooxygenases act in concert with terminal synthases for the production of the various prostanoids. For example, mPGES-1 has been shown to be preferentially coupled to COX-2, as compared to COX-1, in stably transfected cells [19]. Up-regulation of COX-2 by interleukin-1 $\beta$  in human umbilical vein endothelial cells leads to selective increases in PGE<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  production as compared to TXB<sub>2</sub> [20]. These apparent coupling of terminal synthases with cyclooxygenases could be explained by physical coupling, different kinetic properties of terminal synthases, or simply coordinate up-regulation of the cyclooxygenase and a specific terminal synthase. In animal models of carageenan-induced paw edema and LPS-induced pyresis, the co-induction of mPGES-1 and COX-2 is responsible for the observed elevated PGE<sub>2</sub> production in the central nervous system [21,22].

As indicated above, data from *in vitro* studies raise the possibility that COX-2 could preferably couple to terminal synthases for the production of PGI<sub>2</sub> or PGE<sub>2</sub>. In addition, COX-2 slightly differs from COX-1 in its sensitivity to activation by exogenous arachidonic acid [23], in its response to peroxide tone [24], and in its coupling with different phospholipases [25]. It is thus difficult to estimate relative activities of COX-1 and COX-2 from *in vitro* or *ex vivo* assays since the conditions of

activation of both isoforms might not reflect the *in vivo* situation. The aim of the present study was to determine the contribution of COX-2 to the synthesis of prostanoids under conditions where the activity of COX-2 is dependent on physiological conditions for its supply of the arachidonic acid substrate. Our data demonstrate that constitutively expressed COX-2 in rat kidney and forebrain contributes significantly to the production of prostanoids for each of the prostaglandin, prostacyclin, and thromboxane pathways.

## EXPERIMENTAL

### Materials

The prostaglandin standards (6-keto-PGF<sub>1α</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, and TXB<sub>2</sub>) used for liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) quantification were purchased as solids from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI) and were reweighed using a microbalance. Corresponding deuterated prostaglandins and indomethacin were also purchased from Cayman Chemicals. The selective cyclooxygenase inhibitors MF tricyclic [26], SC-560 [27], and DFU [28] were synthesized at Merck Frosst. Complete<sup>®</sup> Protease Inhibitor tablets were purchased from Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

### Animal Procedures

All animal procedures were approved by the Animal Care Committee at the Merck Frosst Centre for Therapeutic Research (Kirkland, Québec, Canada) and respected the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, Canada) weighing 225-275 g were deprived of food but had free access to water for 16 hours prior to administration of vehicle or inhibitors. Compounds were administered *p.o.* in a 0.5% methocellulose vehicle (10 ml/kg) for a period of 4 hours. The inhibitor doses were selected in order to obtain potent inhibition of COX-1 with SC-560, 10 mg/kg [27] or COX-2 with MF tricyclic, 5 mg/kg and DFU, 10 mg/kg [28] but also at a dose to assure selectivity towards the other COX isoform.

### **Preparation of Tissues Extracts**

Animals were sacrificed by pentobarbital injection (120 mg/kg, *i.p.*) and tissues were collected as fast as possible, rinsed in PBS buffer containing 10  $\mu$ M indomethacin, and frozen in liquid nitrogen. Samples were kept at -80°C until analysis. Frozen tissues were pulverized in liquid nitrogen using a mortar and pestle until a fine powder was obtained. This powder was then homogenized in 7-10 volumes of ice-cold PBS, pH 7.4 (supplemented with 2 mM DTT, 10  $\mu$ M indomethacin, and 1 $\times$  Complete<sup>®</sup> Protease Inhibitor mixture) using a tissue tearer (polytron PRO 200). The homogenates were subsequently sonicated on ice for 10-30 sec (Cole-Parmer ultrasonic homogenizer, 50% output) before being subjected to centrifugation for 10 min at 1,000  $\times g$  (4°C). Supernatants were collected for LC-MS analysis, quantification of MF tricyclic concentration by HPLC, as well as protein quantification by a modified Bradford method (Bio-Rad protein assay).

### **Quantification of Prostanoid Content in Tissue Homogenates by LC-MS**

6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  (stable breakdown product of PGI<sub>2</sub>) PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , and TXB<sub>2</sub> (stable breakdown product of TXA<sub>2</sub>) were detected in each sample by LC-MS. Sample aliquots (100  $\mu$ l) were protein-precipitated by addition of 150  $\mu$ l of acetonitrile containing 2 ng/ml of deuterated prostanoids that served as internal standards for quantification (*d*<sub>4</sub>-PGE<sub>2</sub> was used as internal standard for both PGE<sub>2</sub> and PGD<sub>2</sub>). Samples were vortexed and centrifuged for 10 min at 1,200  $\times g$  (4°C) and the supernatants were transferred to a new 96-well plate. Samples (50  $\mu$ l) were analyzed by LC-MS. Details of the procedure as well as optimized parent mass and fragment mass

sensitivity for each prostaglandin have been reported previously [21]. For the whole kidney samples in the DFU experiment, prostanoids were concentrated by solid phase extraction prior to LC-MS in order to increase the detection limit. Briefly, 0.9 ml aliquots of whole kidney homogenates were protein-precipitated with 1.5 ml of acetonitrile containing deuterated internal standards. Samples were vortexed, centrifuged for 10 min at  $1,200 \times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) and supernatants (2 ml) were added onto 4 volumes of  $\text{H}_2\text{O}$ . The pH was then adjusted to 3-3.5 with dilute HCl and samples were applied on SEP-PAK  $\text{C}_{18}$  cartridges (Waters) that had been pre-rinsed with methanol and  $\text{H}_2\text{O}$ . Cartridges were then washed with hexane and prostanoids were eluted with ethyl acetate. The eluate was evaporated under  $\text{N}_2$  and resuspended in 150  $\mu\text{l}$  of acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  (60:40, v/v) prior to prostanoid quantification by LC-MS.

#### **Measurement of MF Tricyclic Plasma and Tissue Levels**

Aliquots of plasma or tissue extracts were protein-precipitated with 1 volume of acetonitrile, vortexed, and centrifuged for 20 min at  $9,000 \times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Supernatants were recovered and injected (100  $\mu\text{l}$ ) onto a  $4.6 \times 150$  mm Zorbax RX- $\text{C}_{18}$  column (Agilent Technologies) using an Agilent 1100 HPLC system with UV detection at 275 nm. MF tricyclic was eluted at 1 ml/min using a linear gradient from 30 to 50% acetonitrile vs. 20 mM ammonium acetate/methanol (90:10, v/v) over 15 min. Quantification was achieved by comparison with a standard curve prepared with vehicle-treated samples to which were added known amounts of MF tricyclic.

### **Statistical Analysis**

The data were log-scaled so that underlying assumptions of equal variance and normality were better satisfied and standard one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare the different treatment groups. Fisher's LSD (Least Significant Difference) method was used as post hoc analysis, and results were considered statistically significant at the  $p < 0.05$  level. All data were back-transformed to original scale and are expressed as geometric mean  $\pm$  standard error of the mean, which was determined by analysis of the variance of all treatment groups.

## RESULTS

### **Prostanoid Levels in Brain and Kidney are Selectively Affected by COX-2 Inhibitors**

In order to evaluate the relative importance of each COX isoform on the basal generation of prostanoids, Sprague-Dawley rats were administered either SC-560 (selective COX-1 inhibitor), MF tricyclic (selective COX-2 inhibitor), or vehicle for 4 hours. The different tissues were then collected and the major prostanoids were quantified by LC-MS. Table 1 summarises the data for the total amount of prostanoids measured in each tissue of vehicle treated animals. Vena cava and lung tissues contained the highest level of total prostanoid content while liver and kidney showed the lowest amounts. Furthermore, analysis of prostanoid profiles revealed differences among tissues. 6-keto-PGF<sub>1α</sub> was the main prostanoid found in lung, lymph nodes, bladder, and aorta. In the ileum, PGD<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> was the major product, the kidney contained predominately PGF<sub>2α</sub>, and in the forebrain and liver, the main prostaglandins detected were PGF<sub>2α</sub> and PGD<sub>2</sub>. As for vena cava, the prostanoids were almost evenly distributed between 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, PGD<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub>.

Figure 1 shows that treatment of the animals with the selective COX-1 inhibitor SC-560 (10 mg/kg) resulted in a significant decrease of total prostanoid levels in ileum, lymph nodes, bladder, aorta, and kidney (60-75% inhibition) and a more modest inhibition in the lung (36%). On the other hand, selective COX-2 inhibition with MF tricyclic (5 mg/kg) did not significantly affect total prostanoid content in any of these tissues with the exception of kidney where a 49% inhibition was observed (Figure 1). In this experiment, MF tricyclic was administered at a dose 2- to 5-fold higher than the



ED<sub>50</sub> for anti-inflammatory effects in COX-2 dependent models (ED<sub>50</sub> of 1 mg/kg in the rat model of adjuvant-induced arthritis and 2.8 mg/kg in the carrageenan-paw edema assay; C-C. Chan, Merck Frosst, unpublished data). In addition, the plasma concentration of MF tricyclic (3.1 μM) was in the range of efficacious doses [26] and was sufficient to inhibit COX-2 (IC<sub>50</sub> = 0.5 μM), but lower than that causing inhibition of COX-1 (IC<sub>50</sub> ≥ 15 μM) as determined in human whole blood assays *in vitro* [29] or using a cell assay with CHO cells transfected with rat COX-1 (IC<sub>50</sub> > 50 μM, unpublished data). Furthermore, tissue concentrations of MF tricyclic were also measured (Table 2) and indicate that the MF tricyclic has a very good distribution in all tissues examined.

In order to independently confirm the effect of COX-2 inhibition on renal prostanoids, another selective COX-2 inhibitor (DFU) was used (SC-560 was not repeated in this experiment). DFU has been shown to be efficacious as a COX-2 inhibitor in various models of inflammation in the rat at 1 mg/kg and to possess a very high degree of selectivity for COX-2 inhibition [28]. Administration of DFU (10 mg/kg) resulted in a significant 37% inhibition ( $p < 0.05$ ) of total renal prostanoids, confirming the effect observed with MF tricyclic (Figure 2). In this experiment, the forebrain was also collected for analysis. A significant 35% inhibition ( $p < 0.05$ ) of prostanoid content in the forebrain was observed following DFU treatment (Figure 2).

In the present experiments, the doses of SC-560 and MF tricyclic were carefully chosen to achieve efficient inhibition of each COX isoform while maintaining selectivity. To further evaluate the extent of COX inhibition caused by these inhibitors, an additional experiment was performed to compare the effect of the combined

administration of SC-560 and MF tricyclic with that of the non-selective indomethacin (5 mg/kg). Total prostanoid content was measured 4 h post administration and found to be strongly inhibited by the combination of inhibitors in the aorta, brain and kidney (Table 3). The extent of inhibition (73-83%) with the combination was similar to that of indomethacin for the aorta and brain, and slightly lower than indomethacin for the kidney (71 vs. 86%). In the lung the combination was ineffective whereas indomethacin caused inhibition comparable to that measured in the other tissues (77%). These data indicate that efficient inhibition of total COX activity can be achieved in aorta, brain and kidney tissues, but not in the lung where SC-560 and MF tricyclic, administered alone or in combination, have slight or no effects on tissue prostanoid content.

#### **Tissue Processing Can Stimulate *Ex Vivo* Prostanoid Production**

In all studies on the measurement of prostanoid levels, the tissues were flash frozen in the presence of indomethacin to minimize the possibility of prostanoid production after tissue collection. Tissue dissection and preparation of subfractions was found to result in stimulation of prostanoid release and did not permit to enrich for fractions that might have been more sensitive to COX-2 inhibition. For example, dissection of one of the kidneys from a vehicle-treated group into cortex and medulla revealed that the total prostanoid content in each of the dissected tissues was higher than that observed in the whole kidney (Table 4). The observed increase, once normalized for weight, corresponded to a 6.5 fold induction of total prostanoid content in dissected cortex and medulla compared to whole kidney homogenates. Interestingly, the observed increase was larger for PGE<sub>2</sub> and 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  as compared to the other prostanoids.

Presumably, activation of phospholipases following tissue damage can stimulate arachidonic acid release and COX activity, leading to an increased prostanoid production in fractionated kidney extracts.

### **Profile of Prostanoid Content in Kidney and Brain Following Selective COX Inhibition**

To evaluate the importance of each of COX-1 and COX-2 in the different prostanoid pathways, the effect of selective COX inhibitors on the prostanoid profile was examined. Interestingly, in the kidney, a significant decrease of all individual prostanoids was observed following administration of either SC-560 or MF tricyclic (Figure 3). The percentage inhibition caused by SC-560 was 81% for 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , 61% for PGE<sub>2</sub>, 41% for PGD<sub>2</sub>, 64% for PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , and 68% for TXB<sub>2</sub>. The inhibition caused by MF tricyclic was 54% for 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , 28% for PGE<sub>2</sub>, 49% for PGD<sub>2</sub>, 53% for PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , and 47% for TXB<sub>2</sub>. Statistical significance was obtained for every prostanoid, except PGE<sub>2</sub>. However, in two other independent experiments, PGE<sub>2</sub> levels were significantly inhibited in the kidney following COX-2 inhibition (60% with MF tricyclic,  $p < 0.001$  and 44% with DFU,  $p < 0.05$ ; data not shown).

In the forebrain, selective COX-2 inhibition caused a significant decrease of all individual prostanoid levels, with the exception of PGD<sub>2</sub> (Figure 4). The inhibition caused by DFU was 41% for 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , 29% for PGE<sub>2</sub>, 17% for PGD<sub>2</sub> (not significant) and 59% for PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . In summary, these data demonstrate that the inhibition of constitutively expressed COX-2 results in decreased levels of several major prostanoids of kidney and brain, including those of the major PGI<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> pathways.

## DISCUSSION

This study focused on role of constitutive COX-2 in the production of prostaglandins and thromboxane. By analysing the effects of selective COX-2 inhibitors on tissue prostanoid levels in rats, we show that constitutive COX-2 is catalytically active in kidney and forebrain under non-inflammatory conditions. No significant contribution of COX-2 to prostanoid synthesis in any other tissues examined was detected using whole tissue extracts. Moreover, the results of the present study suggest that COX-2 can be limiting for the constitutive synthesis of each of the PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, and TX pathways in kidney and forebrain.

### **Production of Prostanoids During Processing of Tissues**

By measuring the tissue levels rather than the *ex vivo* or *in vitro* production of prostanoids, our objective was to obtain a more accurate estimation of COX-2 mediated prostanoid production under conditions where enzyme activity is dependent on endogenous release of the arachidonic acid substrate. To minimize post-harvesting production of prostanoids, especially in tissues where COX-2 is expressed at low levels compared to COX-1, tissues were harvested rapidly, flash frozen, grinded in liquid nitrogen, and homogenized in buffer containing indomethacin. The results obtained from the dissection of the kidney indicate that levels of prostanoids can be induced easily by tissue manipulation and that special care needs to be taken in order to measure levels that accurately reflect the basal levels *in vivo*. Although it is virtually impossible to ascertain that the measured levels correspond to the *in vivo* levels, and that the extent of inhibition might be underestimated, the contribution of constitutive COX-2 to the

production of prostanoids in kidney and brain, as well as the particular sensitivity of these tissues to selective COX-2 inhibition, was demonstrated in the present experiments.

### **Relative Contribution of COX-1 and COX-2 to Prostanoid Synthesis**

The data with the selective inhibitor SC-560 confirmed the predominant role of COX-1 in the synthesis of prostanoids in most tissues [12]. Inhibition of COX-2 with the selective inhibitors did not affect the prostanoid content in any of the selected tissues, with the exception of brain and kidney.

The reduction of renal prostanoid levels by selective COX-2 inhibition was confirmed with two different inhibitors (DFU and MF tricyclic). These results are in line with previous experiments in which *ex vivo* brain  $\text{PGF}_{2\alpha}$  along with kidney  $\text{PGE}_2$  and 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  production was found to be slightly inhibited by the selective COX-2 inhibitor NS-398 administered at 3 and 9 mg/kg (28% inhibition of brain  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $p < 0.05$  and a non significant 20% inhibition for kidney  $\text{PGE}_2$  and 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ) [30]. However, the results on the inhibition of renal COX-2 are in contrast to those observed in kidney extracts using added arachidonic acid for which  $\text{PGE}_2$  production is COX-1 dependent [31]. The lack of inhibition of prostanoid synthesis following selective COX-2 inhibition in *ex vivo* or *in vitro* assays where exogenous arachidonic acid is added, as opposed to the results presented here, suggests that the availability of arachidonic acid might be more limiting for the activity of COX-1 as compared to COX-2 in the kidney under basal conditions.

The lung constitutively expresses both COX-1 and COX-2; however this tissue was found to be rather insensitive to inhibition by SC-560 and MF tricyclic (a low level of inhibition was detected with SC-560 and was not confirmed in the combination experiment). A complication for analysis of the lung tissue is that euthanasia (by barbiturates and other methods) has been shown to affect the pulmonary vasculature [32], which could result in a stimulation of prostacyclin production (6-keto-PGF<sub>1α</sub> was the major product detected in lung extracts), therefore masking the inhibitory effects of the selective inhibitors. In this case, the very slow off-rate of indomethacin from both forms of COXs [33] might have contributed to the maintenance of enzyme inhibition, which could explain the higher level of inhibition as compared to that of SC-560 which is more rapidly reversible [34]. It is also possible that the inhibitors used do not reach the site of active cyclooxygenase; more work will be required to define the contribution of COX-1 and COX-2 to prostanoid synthesis in the lung.

### **Kidney and Brain Prostanoid Profiles**

In the kidney and forebrain, COX-2 inhibition caused a decrease of the concentration of all the individual prostanoids measured, except brain PGD<sub>2</sub>. This suggests that COX-2 can be limiting for the synthesis of a fraction of these prostanoids in these tissues. Of the two major PGs of the forebrain, PGF<sub>2α</sub> was inhibited, while PGD<sub>2</sub> was not significantly affected by selective COX-2 inhibition. These results can be interpreted in many ways, one of which could be preferential coupling of COX-1 to PGD<sub>2</sub> synthase in this tissue in normal conditions. Alternatively, PGD<sub>2</sub> might have a slower turnover than the other prostanoids in the brain and not be produced to a

significant level during the 4 hour treatment period. Conversely, in the kidney, the individual prostaglandins were all inhibited to a similar degree (about 50%); hence the data do not provide any evidence of preferential coupling of COX-2 to a specific terminal synthase pathway at the whole tissue level, although coupling in sub-compartments of the kidney [35] can not be excluded.

It is well known that COX-2 inhibitors and NSAIDs can cause fluid retention and increase blood pressure [36]. The importance of COX-2 derived prostanoids in the regulation of renal physiology is well established [37], but the exact prostaglandins implicated in these phenomena have not been clearly identified. Results obtained from mice lacking the prostacyclin receptor suggest that prostacyclin is the key player for stimulation of renin release in response to renal artery stenosis [38]. However, PGE<sub>2</sub> has also been proposed to be important for the stimulation of renin release, as the rate of renin secretion was stimulated by PGE<sub>2</sub> in perfused kidneys of mice [39]. This stimulation was less important in kidneys isolated from mice lacking either of the PGE<sub>2</sub> receptors EP<sub>2</sub> or EP<sub>4</sub> [39]. These reports suggest that prostanoids, especially PGI<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub>, can both play a role in regulating renal physiology. Moreover, since COX-2 inhibitors affect both of these prostanoid pathways in the kidney, selective inhibitors of terminal synthases, such as microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 [40], have the potential to differ from COX-2 inhibitors or NSAIDs with regard to renal side effects.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Kevin Bateman and Marc Ouellet (Merck Frosst) for technical advice and support for the LC-MS analysis, Denis Normandin, Simon Wong, and the Comparative Medicine Department staff (Merck Frosst) for animal procedures, and the staff of the Medicinal Chemistry Department (Merck Frosst) for the synthesis of SC-560, MF tricyclic, and DFU. This work was supported in part by fellowships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from the Department of Biochemistry at the Université de Montréal to P.O.H.



**REFERENCES**

- 1 Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* **231**, 232-235
- 2 Hinz, B. and Brune, K. (2002) Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* **300**, 367-375
- 3 Smith, W. L., Garavito, R. M., and DeWitt, D. L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol. Chem.* **271**, 33157-33160
- 4 Smith, W. L., DeWitt, D. L., and Garavito, R. M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem* **69**, 145-182
- 5 Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-1875
- 6 Warner, T. D. and Mitchell, J. A. (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J* **18**, 790-804
- 7 Breder, C. D., Dewitt, D., and Kraig, R. P. (1995) Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol.* **355**, 296-315
- 8 Harris, R. C., McKanna, J. A., Akai, Y., Jacobson, H. R., Dubois, R. N., and Breyer, M. D. (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin. Invest* **94**, 2504-2510

- 9 Ermert, L., Ermert, M., Goppelt-Struebe, M., Walmrath, D., Grimminger, F., Steudel, W., Ghofrani, H. A., Homberger, C., Duncker, H., and Seeger, W. (1998) Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. *Am. J Respir. Cell Mol Biol.* **18**, 479-488
- 10 Lazarus, M., Eguchi, N., Matsumoto, S., Nagata, N., Yano, T., Killian, G. J., and Urade, Y. (2004) Species-specific expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 and cyclooxygenases in male monkey reproductive organs. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **71**, 233-240
- 11 Beiche, F., Scheuerer, S., Brune, K., Geisslinger, G., and Goppelt-Struebe, M. (1996) Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett.* **390**, 165-169
- 12 Vane, J. R., Bakhle, Y. S., and Botting, R. M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* **38**, 97-120
- 13 Yamagata, K., Andreasson, K. I., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., and Worley, P. F. (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* **11**, 371-386
- 14 Yang, T., Singh, I., Pham, H., Sun, D., Smart, A., Schnermann, J. B., and Briggs, J. P. (1998) Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am. J Physiol* **274**, F481-F489

- 15 Nantel, F., Meadows, E., Denis, D., Connolly, B., Metters, K. M., and Giaid, A. (1999) Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. *FEBS Lett.* **457**, 475-477
- 16 Catella-Lawson, F., McAdam, B., Morrison, B. W., Kapoor, S., Kujubu, D., Antes, L., Lasseter, K. C., Quan, H., Gertz, B. J., and FitzGerald, G. A. (1999) Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 735-741
- 17 Mann, B., Hartner, A., Jensen, B. L., Kammerl, M., Kramer, B. K., and Kurtz, A. (2001) Furosemide stimulates macula densa cyclooxygenase-2 expression in rats. *Kidney Int* **59**, 62-68
- 18 Schwartz, J. I., Vandormael, K., Malice, M. P., Kalyani, R. N., Lasseter, K. C., Holmes, G. B., Gertz, B. J., Gottesdiener, K. M., Laurenzi, M., Redfern, K. J., and Brune, K. (2002) Comparison of rofecoxib, celecoxib, and naproxen on renal function in elderly subjects receiving a normal-salt diet. *Clin. Pharmacol Ther* **72**, 50-61
- 19 Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S., and Kudo, I. (2000) Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* **275**, 32783-32792

- 20 Caughey, G. E., Cleland, L. G., Penglis, P. S., Gamble, J. R., and James, M. J. (2001) Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol.* **167**, 2831-2838
- 21 Guay, J., Bateman, K., Gordon, R., Mancini, J., and Riendeau, D. (2004) Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. *J Biol. Chem.* **279**, 24866-24872
- 22 Inoue, W., Matsumura, K., Yamagata, K., Takemiya, T., Shiraki, T., and Kobayashi, S. (2002) Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. *Neurosci. Res* **44**, 51-61
- 23 Swinney, D. C., Mak, A. Y., Barnett, J., and Ramesha, C. S. (1997) Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid. *J Biol. Chem.* **272**, 12393-12398
- 24 Chen, W., Pawelek, T. R., and Kulmacz, R. J. (1999) Hydroperoxide dependence and cooperative cyclooxygenase kinetics in prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol. Chem.* **274**, 20301-20306
- 25 Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., and Kudo, I. (1999) Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem.* **274**, 3103-3115

- 26 Oshima, M., Dinchuk, J. E., Kargman, S. L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J. M., Evans, J. F., and Taketo, M. M. (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* **87**, 803-809
- 27 Smith, C. J., Zhang, Y., Koboldt, C. M., Muhammad, J., Zweifel, B. S., Shaffer, A., Talley, J. J., Masferrer, J. L., Seibert, K., and Isakson, P. C. (1998) Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **95**, 13313-13318
- 28 Riendeau, D., Percival, M. D., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Falguyret, J. P., Ford-Hutchinson, A. W., Gordon, R., Greig, G., Gresser, M., Guay, J., Kargman, S., Leger, S., Mancini, J. A., O'Neill, G., Ouellet, M., Rodger, I. W., Therien, M., Wang, Z., Webb, J. K., Wong, E., Xu, L., Young, R. N., Zamboni, R., Prasit, P., and Chan, C. C. (1997) Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol* **121**, 105-117
- 29 Riendeau, D., Salem, M., Styhler, A., Ouellet, M., Mancini, J. A., and Li, C. S. (2004) Evaluation of loxoprofen and its alcohol metabolites for potency and selectivity of inhibition of cyclooxygenase-2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1201-1203
- 30 Tegeder, I., Neupert, W., Guhring, H., and Geisslinger, G. (2000) Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther* **292**, 1161-1168

- 31 Chan, C. C., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Ford-Hutchinson, A. W., Forrest, M. J., Gauthier, J. Y., Gordon, R., Gresser, M., Guay, J., Kargman, S., Kennedy, B., Leblanc, Y., Leger, S., Mancini, J., O'Neill, G. P., Ouellet, M., Patrick, D., Percival, M. D., Perrier, H., Prasit, P., Rodger, I., Tagari, P., Therien, M., Vickers, P., Visco, D., Wang, Z., Webb, J., Wong, E., Xu, L. J., Young, R. N., Zamboni, R., and Riendeau, D. (1999) Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther* **290**, 551-560
- 32 Feldman, D. B. and Gupta, B. N. (1976) Histopathologic changes in laboratory animals resulting from various methods of euthanasia. *Lab Anim Sci* **26**, 218-221
- 33 Kargman, S., Wong, E., Greig, G. M., Falgueyret, J. P., Cromlish, W., Ethier, D., Yergey, J. A., Riendeau, D., Evans, J. F., Kennedy, B., Tagari, P., Francis, D. A., and O'Neill, G. P. (1996) Mechanism of selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 in intact cells. *Biochem Pharmacol* **52**, 1113-1125
- 34 Walker, M. C., Kurumbail, R. G., Kiefer, J. R., Moreland, K. T., Koboldt, C. M., Isakson, P. C., Seibert, K., and Gierse, J. K. (2001) A three-step kinetic mechanism for selective inhibition of cyclo-oxygenase-2 by diarylheterocyclic inhibitors. *Biochem J* **357**, 709-718
- 35 Schneider, A., Zhang, Y., Zhang, M., Lu, W. J., Rao, R., Fan, X., Redha, R., Davis, L., Breyer, R. M., Harris, R., Guan, Y., and Breyer, M. D. (2004)

Membrane-associated PGE synthase-1 (mPGES-1) is coexpressed with both COX-1 and COX-2 in the kidney. *Kidney Int* **65**, 1205-1213.

- 36 Cheng, H. F. and Harris, R. C. (2004) Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension* **43**, 525-530
- 37 Harris, R. C., Zhang, M. Z., and Cheng, H. F. (2004) Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. *Acta Physiol Scand.* **181**, 543-547
- 38 Fujino, T., Nakagawa, N., Yuhki, K., Hara, A., Yamada, T., Takayama, K., Kuriyama, S., Hosoki, Y., Takahata, O., Taniguchi, T., Fukuzawa, J., Hasebe, N., Kikuchi, K., Narumiya, S., and Ushikubi, F. (2004) Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I<sub>2</sub> receptor IP. *J Clin. Invest* **114**, 805-812
- 39 Schweda, F., Klar, J., Narumiya, S., Nusing, R. M., and Kurtz, A. (2004) Stimulation of renin release by prostaglandin E<sub>2</sub> is mediated by EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptors in mouse kidneys. *Am. J Physiol Renal Physiol* **287**, F427-F433
- 40 Uematsu, S., Matsumoto, M., Takeda, K., and Akira, S. (2002) Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol.* **168**, 5811-5816

**TABLES****Table 1. Relative abundance of each prostanoid measured in different rat tissues**

Total prostanoid content (6-keto-PGF<sub>1α</sub> + PGE<sub>2</sub> + PGD<sub>2</sub> + PGF<sub>2α</sub> + TXB<sub>2</sub>) in various tissues of vehicle treated animals (n=8-10) was quantified by LC-MS. Values are expressed as % of each prostanoid compared to the total concentration of measured prostanoids.

Tissue	Total Prostanoid (ng/mg protein)	6-keto- PGF <sub>1α</sub>	PGE <sub>2</sub>	PGD <sub>2</sub>	PGF <sub>2α</sub>	TXB <sub>2</sub>
Vena cava	2.17 ± 0.41	38%	8.4%	30%	nd*	24%
Lung	2.16 ± 0.30	75 %	2.4 %	4.6 %	5.8 %	12 %
Lymph nodes	1.58 ± 0.26	58 %	7.0 %	17 %	6.7 %	11 %
Ileum	1.51 ± 0.26	30 %	15%	36%	7.7 %	11 %
Bladder	1.18 ± 0.15	59%	7.5 %	8.3 %	21 %	4.8 %
Aorta	0.86 ± 0.16	58 %	3.3 %	13 %	nd*	26 %
Forebrain	0.83 ± 0.07	14 %	7.5%	42%	37%	nd*
Liver	0.21 ± 0.02	3.5 %	18 %	43 %	30 %	6.7 %
Kidney	0.20 ± 0.02	18 %	14 %	11 %	49 %	8.6 %

\* nd = not detected.



**Table 2. Tissue concentrations of MF tricyclic**

Tissue concentrations of MF tricyclic were determined by HPLC as described in Materials and Methods. MF tricyclic was administered at 5 mg/kg and tissues were collected 4 hours post-dose. Molar concentrations were calculated by approximating tissue density to 1 mg/ml. Values are displayed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=5-10).

Tissue	MF tricyclic concentration ( $\mu$ M)
Lung	7.8 $\pm$ 1.1
Ileum	5.5 $\pm$ 0.7
Lymph nodes	2.3 $\pm$ 0.2
Bladder	2.8 $\pm$ 0.2
Aorta	4.1 $\pm$ 1.0
Liver	8.3 $\pm$ 0.8
Kidney	7.8 $\pm$ 0.4
Plasma	3.1 $\pm$ 0.3

**Table 3. Inhibition of total prostanoid content in selected rat tissues by co-administration of selective COX inhibitors (SC-560 + MF tricyclic) and indomethacin**

Animals were administered vehicle (0.5% methocellulose), SC-560 (10 mg/kg) + MF tricyclic (5 mg/kg), or indomethacin (5 mg/kg) for 4 h and levels of total prostanoids (6-keto-PGF<sub>1α</sub> + PGE<sub>2</sub> + PGD<sub>2</sub> + PGF<sub>2α</sub> + TXB<sub>2</sub>) were determined for the indicated tissues. Data are reported as percentage inhibition ± S.E.M. compared to vehicle-treated animals (n=8).

	% Inhibition	
	SC-560 + MF tricyclic	Indomethacin
Aorta	73 ± 7 % *	84 ± 4 % *
Forebrain	83 ± 3 % *	76 ± 4 % *
Lung	-13 ± 29 %	77 ± 6 % *
Kidney	71 ± 7 % *	86 ± 3 % *

\* Significantly different ( $p < 0.05$ ) from vehicle.

**Table 4. Increased prostanoid content in dissected kidney cortex and medulla as compared to whole kidney extracts**

Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. of n=5.

	Whole kidney (pg / mg tissue)	Cortex (pg / mg tissue)	Medulla (pg / mg tissue)	Fold Induction*
6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub>	0.7 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 1.0 <sup>†</sup>	5.2 $\pm$ 1.7 <sup>†</sup>	13
PGE <sub>2</sub>	0.9 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 1.4 <sup>†</sup>	7.2 $\pm$ 2.0 <sup>†</sup>	13
PGD <sub>2</sub>	0.6 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.4 <sup>†</sup>	0.6 $\pm$ 0.1	5.0
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	1.7 $\pm$ 0.3	nd <sup>‡</sup>	2.1 $\pm$ 0.4	1.2
TXB <sub>2</sub>	0.21 $\pm$ 0.07	1.1 $\pm$ 0.4 <sup>†</sup>	0.4 $\pm$ 0.1	7.5
Total prostanoids	4.4 $\pm$ 1.0	12 $\pm$ 2.7 <sup>†</sup>	16 $\pm$ 3.5 <sup>†</sup>	6.5

\* Fold induction of cortex + medulla over whole kidney homogenates. The value for (cortex + medulla) is obtained by normalizing the detected prostanoid concentrations for weight (cortex  $\times$  % weight of total kidney) + (medulla  $\times$  % weight of total kidney).

<sup>†</sup> Statistically different ( $p < 0.05$ ) from corresponding values of whole kidney level.

<sup>‡</sup> nd = not detected.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. Effect of treatment with selective COX-1 inhibitor SC-560 or selective COX-2 inhibitor MF tricyclic on total prostanoid content of various rat tissues**

Animals were administered vehicle (0.5% methocellulose), SC-560 (10 mg/kg), or MF tricyclic (5 mg/kg) for 4 hours and levels of total prostanoids (6-keto-PGF<sub>1α</sub> + PGE<sub>2</sub> + PGD<sub>2</sub> + PGF<sub>2α</sub> + TXB<sub>2</sub>) were determined for the indicated tissues. Error bars represent S.E.M. of n=8-10 animals, and significantly different levels compared to matching vehicles are depicted above the corresponding bars as follows: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .

### **Figure 2. Effect of selective COX-2 inhibition on total prostanoid content of rat kidney and forebrain**

Vehicle (0.5% methocellulose) or DFU (10 mg/kg) was administered to rats for 4 hours and total prostanoid levels were determined (6-keto-PGF<sub>1α</sub> + PGE<sub>2</sub> + PGD<sub>2</sub> + PGF<sub>2α</sub> + TXB<sub>2</sub>) by LC-MS. Error bars represent S.E.M. of n=5-10 animals, and statistical significance is indicated above the corresponding bars as follows: \*  $p < 0.05$ .

**Figure 3. Profile of prostanoid content in rat kidney following selective COX-1 and COX-2 inhibition**

Rats were treated for 4 hours with vehicle (0.5% methocellulose), selective COX-1 inhibitor SC-560 (10 mg/kg), or selective COX-2 inhibitor MF tricyclic (5 mg/kg). Kidneys were collected and analysed for prostanoid content. Error bars represent S.E.M. of n=10 animals, and statistically significant differences from matching vehicles are indicated above the corresponding bars as follows: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 4. Effect of selective COX-2 inhibition on individual prostanoid levels in rat forebrain**

Rats were treated for 4 hours with vehicle (0.5% methocellulose) or selective COX-2 inhibitor DFU (10 mg/kg). The forebrain was collected and analysed for prostanoid content. Error bars represent S.E.M. of n=10 animals, and statistically significant differences from matching vehicles are indicated above the corresponding bars as follows: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ . (nd; not detected)

## FIGURES

Figure 1

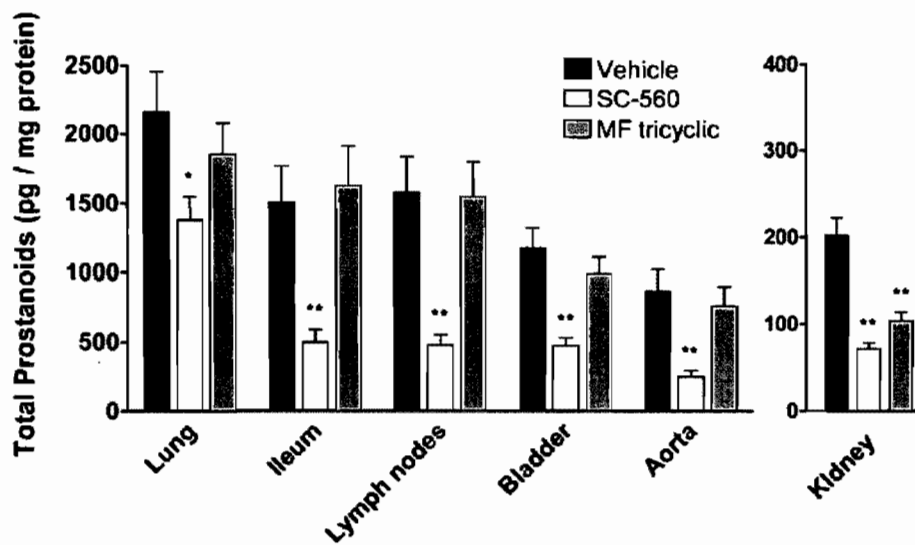


Figure 2

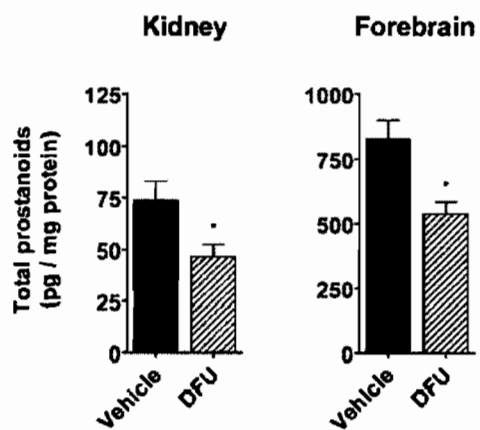


Figure 3

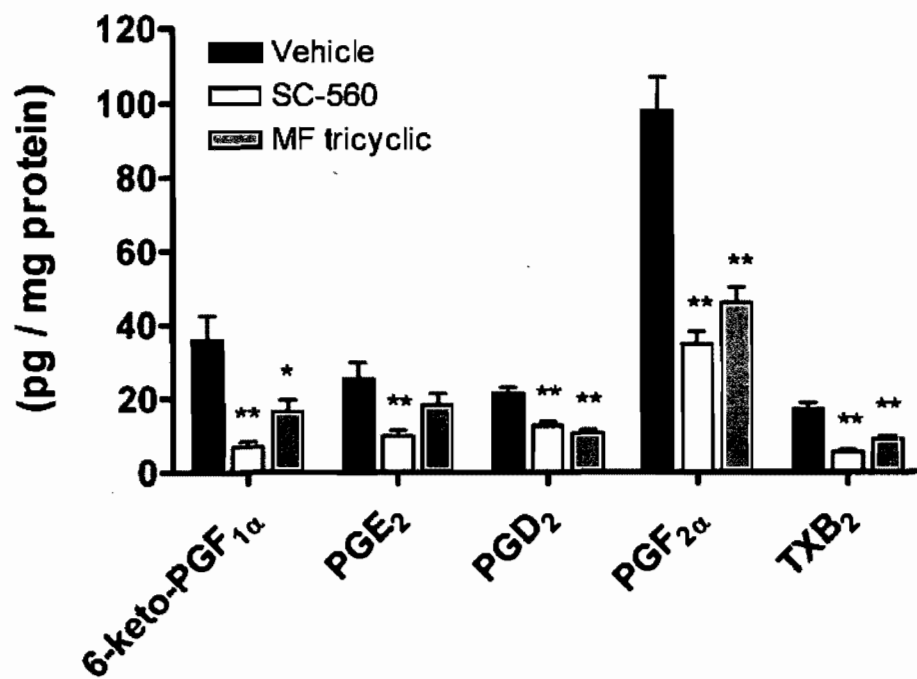
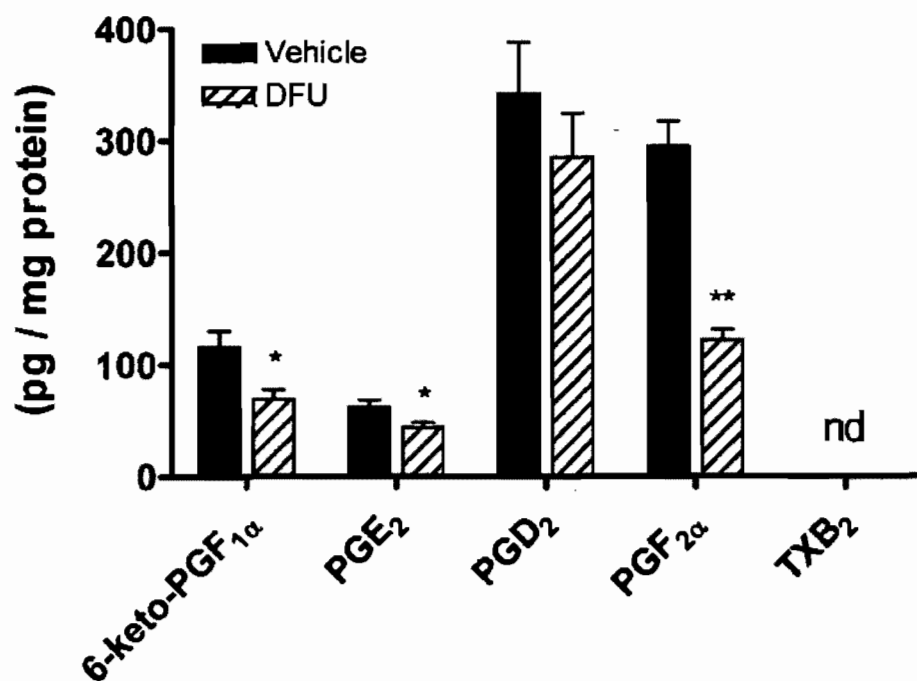


Figure 4



**CHAPITRE 9.**

**Down-regulation of Microsomal PGE<sub>2</sub> Synthase-1 in White Adipose  
Tissue upon High Fat Feeding**

Hétu, P.O. et Riendeau, D. (2007) *Obesity*, 15:60-68.

**Contribution des auteurs:**

Pierre-Olivier Hétu: Expérimentation, analyse des résultats et rédaction du manuscrit.


Denis Riendeau: Supervision générale du projet et rédaction du manuscrit.



## **Down-regulation of Microsomal PGE<sub>2</sub> Synthase-1 in White Adipose Tissue upon High Fat Feeding**

**Pierre-Olivier Héту and Denis Riendeau**

Department of Biochemistry & Molecular Biology, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Kirkland, QC, Canada; and Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Denis Riendeau, Department of Biochemistry & Molecular Biology, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, 16711 Trans-Canada Hwy, Kirkland, QC, Canada, H9H 3L1. Phone: 1-514-428-2673, Fax: 1-514-428-4930. E-mail: 

**Running title:** Decreased mPGES-1 Expression in Obesity

**Abbreviations:** PG, prostaglandin; COX, cyclooxygenase; mPGES-1, microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1; mPGES-2, microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-2; cPGES, cytosolic PGE<sub>2</sub> synthase; WAT, white adipose tissue; LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry.

**Abstract**

**Objective:** Prostaglandin (PG)E<sub>2</sub> is a lipid mediator implicated in inflammatory diseases and in the regulation of lipolysis and adipocyte differentiation. This work was thus undertaken to study the regulation of the various PGE<sub>2</sub> synthases (PGES) in obesity.

**Research Methods and Procedures:** C57Bl/6 mice were subjected to high fat or regular diet for 12 weeks. The levels of PGE<sub>2</sub> in white adipose tissue (WAT) of lean and obese mice were quantified by LC-MS and the change in expression of the three major PGES caused by diet-induced obesity was characterized by western blotting. Human preadipocytes and 3T3-L1 cells were used to assess the expression of mPGES-1 during adipogenesis.

**Results:** Microsomal PGES-1 (mPGES-1), mPGES-2, and cytosolic PGES (cPGES) proteins were all detected in WAT of lean animals. mPGES-1 was expressed at higher levels in WAT than in any other tissues examined and was more abundant (3- to 4-fold) in epididymal (visceral) compared to inguinal (subcutaneous) WAT. Expression of mPGES-1 was also detected in undifferentiated and differentiated 3T3-L1 cells and in human primary subcutaneous preadipocytes at all stages of adipogenesis. The mPGES-1 protein was substantially down-regulated in epididymal and inguinal WAT of obese mice, while mPGES-2 and cPGES remained relatively stable. Concordantly, the PGE<sub>2</sub> levels in obese inguinal WAT were significantly lower than those of lean animals.

**Discussion:** The present data suggest that mPGES-1 is the major form of PGES contributing to the synthesis of PGE<sub>2</sub> in WAT and that its down-regulation might be involved in the alterations of lipolysis and adipogenesis associated with obesity.

**Key words:** Prostaglandins; Subcutaneous Adipose Tissue; Visceral fat; Lipolysis;

## Introduction

Obesity is a condition associated with low-grade chronic inflammation (1-5). The inflammatory condition in obesity is increasingly being recognized as an important contributor to the development of the metabolic syndrome and of its associated complications (4-8). Adipocytes can secrete pro-inflammatory factors, such as plasminogen activator inhibitor-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (5,6,9). Overall, the increase in adipose tissue during obesity is associated with elevated circulating levels of several markers of inflammation and of cytokines (5,10,11). Moreover, PGE<sub>2</sub> has been shown to inhibit adipocyte lipolysis (12-15). Treatment of adipocytes with nanomolar concentrations of PGE<sub>2</sub> potently inhibits epinephrine- or isoproterenol-induced lipolysis *in vitro* (16,17), and this effect is mediated via inhibition of cAMP accumulation (18), probably through EP3 receptor signalling (19). Additionally, PGE<sub>2</sub> has been shown to negatively affect adipocyte differentiation *in vitro* (20).

Prostaglandins (PGs) are synthesized by the concerted action of cyclooxygenases (COX) and specific terminal synthases (21). Two major isoforms of COX have been identified, COX-1, which mainly synthesizes the PGs required for maintaining homeostasis, and COX-2, which is induced in inflammatory reactions to produce the high levels of PGs observed in those conditions (22). Both enzymes utilize arachidonic acid to synthesize PGH<sub>2</sub>, which is the common precursor for the synthesis of the various PGs (21). PGE<sub>2</sub> is a major PG implicated in inflammatory reactions (23-25) and several proteins with the ability to convert PGH<sub>2</sub> to PGE<sub>2</sub> have been identified, notably microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 (mPGES-1) (26,27), mPGES-2 (28), and

cytosolic PGES (cPGES) (29). mPGES-2 and cPGES are constitutively expressed (29-31), while mPGES-1 is expressed constitutively in many tissues and at elevated levels in various inflammatory conditions (23,24). In such, mPGES-1 represents a novel therapeutic target for the treatment of pain and inflammation (24,31).

Although, PGE<sub>2</sub> is a well characterised antilipolytic agent *in vitro* and a key regulator of inflammation, little is known about the contribution of PGE<sub>2</sub> to the disease state and to the complications of obesity. Furthermore, previous studies with adipocytes isolated from lean and obese WAT have shown that the *ex vivo* production of PGE<sub>2</sub> is altered in adipocytes from obese tissues (9,32). For these reasons, the following study was undertaken to examine the regulation of the major PGE<sub>2</sub> synthases during diet-induced obesity.

## **Research Methods and Procedures**

### *Reagents*

The PG standards used for liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) quantification were purchased as solids from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, U.S.A.) as were the corresponding deuterated internal standards and indomethacin. The antibodies used were as follows: rabbit anti-human mPGES-1 (Oxford Biomedical Research, MI, U.S.A., cat. #PG15), rabbit anti-human mPGES-2 (Cayman Chemicals, cat. #160145), rabbit anti-human cPGES (Cayman Chemicals, cat. #160150), and donkey anti-rabbit IgG (GE Healthcare Bio-Sciences, QC, Canada, cat. #NA934V). Complete® Protease Inhibitor tablets were purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Human preadipocytes with related media and cell culture reagents were obtained from Cambrex (East Rutherford, NJ, U.S.A.). 3T3-L1 cells were purchased from ATCC (Manassas, VA, U.S.A.) and the insulin, dexamethasone, and isobutyl-methylxanthine used to stimulate differentiation were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

### *Animals*

All animal procedures were approved by the Animal Care Committee at the Merck Frosst Centre for Therapeutic Research (Kirkland, QC, Canada) and followed the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care. Lean and obese 18-week old C57Bl/6 male mice were purchased from Taconic (Hudson, NY, U.S.A.). These obese mice were obtained by feeding with a high fat (36% fat, accounting for 59% of calories), high carbohydrate (36%) diet for 12 weeks, starting at 6 weeks of age

(the mice were subjected to high fat diet by the vendor and were already obese when purchased). The high fat diet administered by the vendor was Bio-Serv diet #S3282, with lard as source of fat and thus contained mainly long-chain monounsaturated and saturated fatty acids (45% oleic acid, 25% palmitic acid, and 12% stearic acid), as well as linoleic acid (10%). Control mice were fed regular rodent diet (Taconic, NIH #31M diet) containing ~5.3% fat.

#### *Tissue Preparation for Protein Analysis*

Mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> overdose and tissues were collected as fast as possible, rinsed in PBS buffer containing 10  $\mu$ M indomethacin, and frozen in liquid nitrogen. Samples were kept at -80°C until analysis. Frozen tissues were weighed and then homogenized in 5 volumes of ice-cold homogenizing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; supplemented with 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% octylglucoside, 0.1% SDS, 10  $\mu$ M indomethacin, and 1 $\times$  Complete® Protease Inhibitor mixture) using a Brinkman homogenizer (Polytron). The homogenates were subsequently sonicated on ice for 20 sec (Cole-Parmer ultrasonic homogenizer, 40% output) before being subjected to centrifugation for 20 min at 1,000  $\times$  g (4°C). Supernatants (or soluble fraction between pellet and fat layer, when applicable) were collected with a syringe and transferred to new tubes. Total protein concentration in homogenates was determined by the DC-Lowry protein assay (Bio Rad Laboratories, CA, U.S.A.) as per the manufacturer's instructions.

### *Western Blotting Analysis*

Samples were diluted in homogenizing buffer to have the same total protein content and an appropriate volume of 5× loading buffer was added. Equal quantities of total protein were ran on tris-glycine gels and transferred to PVDF membranes (Invitrogen, Ontario, Canada). Blots were blocked for 1 h in 5% milk/PBST (PBS + 0.1% Tween 20) and then incubated with the appropriate primary antibody in 1% milk/PBST. The antibodies were diluted as follows: 1/1,000 for mPGES-1, 1/500 for mPGES-2 and 1/250 for cPGES. The blots were subsequently washed with PBST and incubated with the secondary antibody (1/5,000) for 1 h. Protein bands were detected with LAS-1000plus CCD camera in an Intelligent DarkBox II (Fujifilm, Ontario, Canada) after incubation in SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, U.S.A.). Quantification of the intensity of the immunoreactive bands was accomplished with Multi Gauge 2.3 software (Fujifilm). The different proteins were detected on the same blot after stripping by incubating membranes for 30 min at 50°C in 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, and 0.7% β-mercaptoethanol.

### *Cell Culture*

3T3-L1 preadipocytes were grown in DMEM containing 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. The cells were brought to confluence and stimulated to differentiate two days later by the addition of growth media supplemented with 10 mM HEPES (pH 7.0), 167 nM human recombinant insulin, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine, and 1 µM dexamethasone. Two days after the start of

differentiation, the differentiation media was replaced by growth media supplemented with HEPES and insulin. After two days (day 4 of differentiation), the media was replaced with regular growth media and cells were fed with fresh growth media every two days until differentiation was complete (10 days after induction). Subcutaneous human preadipocyte ( $1 \times 10^6$  cells) from Cambrex were seeded in a T-175 dish in 35 ml PBM (Preadipocyte Basal Media, from Cambrex) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. Cells were cultured until about 70% confluent and were then trypsinized, counted, diluted to 100,000 cells/ml and seeded in 24 well plates (50,000 cells in 500  $\mu$ l per well). Adipocyte differentiation was initiated on fully confluent preadipocytes by addition of 500  $\mu$ l differentiating media (PBM supplemented with 20  $\mu$ g/ml insulin, 2  $\mu$ M dexamethasone, 1 mM isobutyl-methylxanthine, and 400  $\mu$ M indomethacin) as per the supplier's instructions. At different stages of adipogenesis, cells were washed with DPBS and frozen on dry ice. For analysis of protein expression, cells were thawed briefly on ice (5 min) and 100  $\mu$ l lysis buffer was added to each well for 60 min (20 mM HEPES, pH 7.0; supplemented with 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, and 1 $\times$  Complete<sup>®</sup> Protease Inhibitor mixture).

#### *PGE<sub>2</sub> Quantification by LC-MS*

For the quantification of PGE<sub>2</sub> levels, WAT of lean and obese mice were homogenized as described above, but in PBS buffer supplemented with 10  $\mu$ M indomethacin and 1 $\times$  Complete<sup>®</sup> Protease Inhibitor mixture. An aliquot of homogenate was then protein-precipitated with 2 volumes of acetonitrile containing deuterated



prostaglandin internal standards (350 pg/ml of  $d_4$ -PGE<sub>2</sub>). Samples were then centrifuged for 20 min at  $1,200 \times g$  (4°C). The supernatants were collected and approximately 2.5 volumes of H<sub>2</sub>O were added. The samples were then acidified to pH 3 with HCl 1N and the PGs were extracted by solid phase extraction (SPE) on Sep-Pak C18 cartridges (Waters, Milford, MA, U.S.A.). Briefly, samples were added to Sep-Pak cartridges that had been preincubated with methanol and H<sub>2</sub>O. Cartridges were then washed with hexane and PGs were eluted with ethyl acetate. SPE eluates were evaporated under N<sub>2</sub> and resuspended in 150 µl of PBS/acetonitrile (40:60, v/v). PGE<sub>2</sub> concentration was then quantified by LC-MS as reported previously (33).

#### *Statistical Analysis*

Densitometric data and PGE<sub>2</sub> levels are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparison between the different groups was done using Student's *t*-test. Results were considered statistically different at the  $p < 0.05$  level.

## Results

### *PGE<sub>2</sub> Levels in Subcutaneous WAT are Significantly Decreased in Obese Mice*

Obesity is associated with chronic low-grade inflammation and PGE<sub>2</sub> is often produced at high levels in inflammatory conditions. However, previous studies suggest that the *ex vivo* production of PGE<sub>2</sub> by isolated adipocytes is reduced in obesity (9,32). The levels of this PG were thus quantified in WAT of lean and obese mice to determine if the *in vivo* levels of PGE<sub>2</sub> in WAT vary during obesity. Six week old C57Bl/6 mice were subjected to high fat or regular diet for 12 weeks, and, after this period, mice on the regular diet were lean and of normal appearance while those on high fat diet were obese with a 40% increase in body weight (Table 1). The inguinal (subcutaneous, abdominal) and epididymal (visceral) WAT were collected from 5 lean and 5 obese animals for the measurement of PGE<sub>2</sub> levels by LC-MS. PGE<sub>2</sub> levels in inguinal fat were found to be significantly lower in obese tissues compared to lean tissues when normalized to tissue weight or protein content ( $76 \pm 5\%$  and  $65 \pm 6\%$  inhibition respectively,  $p < 0.05$ , Table 1). PGE<sub>2</sub> levels in obese epididymal WAT could not be detected because of large and irregular unidentified contaminating peaks that co-eluted with PGE<sub>2</sub> on the LC-MS.

### *Tissue Distribution Analysis of the Different PGE<sub>2</sub> Synthases in Mice Reveals a Distinct Pattern for mPGES-1 Expression in WAT*

The expression of the three major PGE<sub>2</sub> synthases was determined in WAT and compared to that of different tissues in lean C57Bl/6 mice (Fig. 1A). When equal amounts of total homogenate protein from different tissues were analyzed, mPGES-1

expression was much more pronounced in epididymal and inguinal WAT than in any other tissue examined (Fig. 1A). The expression of mPGES-1 was also detected in seminal vesicles and in lung, kidney, and spleen, as previously reported (34). As a control, the gel was stained with GelCode Blue (Pierce Biotechnology) after the transfer to ascertain that the protein loading was equivalent for the different tissues analyzed (data not shown). The high expression level of mPGES-1 in WAT as compared to the other tissues is in contrast to the broader pattern of expression observed for mPGES-2 and cPGES. In order to evaluate the capacity of adipocytes to express mPGES-1, mouse 3T3-L1 cells and isolated human subcutaneous preadipocytes were cultured and stimulated to differentiate into adipocytes. The data show that mPGES-1 is expressed both in undifferentiated and differentiated 3T3-L1 cells (Fig. 1B). The mPGES-1 protein was also detected in human primary subcutaneous preadipocytes and mature adipocytes (Fig. 1B), as well as all throughout the adipogenesis process (data not shown). The mPGES-2 protein was also expressed in both mouse and human adipocytes (data not shown).

#### *The Expression of mPGES-1 in WAT is Depot-dependent*

Interestingly, mPGES-1 was expressed at higher levels in epididymal (visceral) WAT as compared to inguinal (subcutaneous) WAT (Fig. 1A, lanes 2 and 3). This depot-dependent intensity of expression was further characterized by quantifying the level of expression of mPGES-1 in epididymal and inguinal WAT of 4 animals and by comparing with that of mPGES-2. As seen in Fig. 2, the expression of mPGES-1 was consistently higher (3- to 4-fold,  $p < 0.05$ ) in epididymal WAT than in inguinal WAT

while the expression of mPGES-2 was similar between the two depots (a 1.6-fold increase that did not reach statistical significance)

*The Expression of mPGES-1 is Selectively Decreased in WAT of Obese Animals*

Since PGE<sub>2</sub> levels were found to be decreased following diet-induced obesity, the effect of high fat feeding on the expression of the different PGE<sub>2</sub> synthases was determined. In both inguinal and epididymal WAT depots, the expression of mPGES-1 was greatly decreased in obese tissues while mPGES-2 and cPGES expression showed minor or no changes (Fig. 3). Acetone extraction of the proteins in the fat cakes [as described in (35)] followed by western blotting analysis ruled out the possibility that a sequestration of mPGES-1 in the fat could explain the observed decrease in expression (data not shown). The mPGES-1 expression in obese inguinal WAT as compared to the lean tissues was decreased by  $65 \pm 4 \%$ ,  $p < 0.05$ , while mPGES-2 and cPGES expression did not vary significantly. The decrease of mPGES-1 was more pronounced in obese epididymal WAT ( $91 \pm 1 \%$  decrease,  $p < 0.05$ ), and was accompanied by a slight increase in mPGES-2 and cPGES levels as compared to lean tissues (1.6- and 2.2-fold increase respectively,  $p < 0.05$ ). The results show that mPGES-1 expression in WAT is greatly reduced during diet-induced obesity and that this modulation of expression is more pronounced than that of the other two major PGE<sub>2</sub> synthases.

## Discussion

We report here that mPGES-1 is expressed at high levels in WAT and adipocytes. The level of expression of mPGES-1 is fat-depot dependent, being higher in epididymal (visceral) as compared to inguinal (subcutaneous, abdominal) WAT. However, both WAT depots express considerably more mPGES-1 than all other tissues examined, including spleen and kidney in which mPGES-1 has previously been demonstrated to play a role in the synthesis of PGE<sub>2</sub> (34). The mPGES-2 and cPGES were also detected in WAT but only within the same range of expression than that of the other tissues. Finally, both the levels of PGE<sub>2</sub> and of mPGES-1 protein were found to be reduced in WAT during obesity, while mPGES-2 and cPGES levels remained relatively constant. All these data indicate that mPGES-1 is playing a role in the regulation of PGE<sub>2</sub> synthesis in the adipose tissue.

Obesity is associated with low-grade chronic inflammation. Although one might expect that macrophage infiltration in obese fat tissue (1,3) could have contributed to an increase in PGE<sub>2</sub> levels, our data rather show a decrease in PGE<sub>2</sub> during diet-induced obesity due to a down-regulation of mPGES-1. Although total PGE<sub>2</sub> content in whole fat pad was not significantly different between lean and obese inguinal WAT, the mean concentrations of PGE<sub>2</sub> in WAT were significantly reduced in obese tissues when normalized to tissue weight or protein content. This decreased PGE<sub>2</sub> content per mg protein correlates with the decreased mPGES-1 expression (on a protein basis and also relative to the other PGES) and suggests that PGE<sub>2</sub> signalling in WAT is most probably decreased in obesity. Interestingly, the present data are consistent with the recent report

by Fain et al. (9) showing that adipocytes isolated from human subcutaneous and visceral WAT of obese individuals (BMI of 45) have a tendency to release lower amounts of PGE<sub>2</sub> (86% decrease,  $p < 0.001$ , and 55% decrease, n.s., respectively) than those of leaner individuals. An overall decreased release rate of PGE<sub>2</sub> by adipocytes isolated from obese Zucker rats (fa/fa) had also previously been reported by Gaskin et al. (32). Our data on the reduced PGE<sub>2</sub> content in obese WAT are thus in agreement with the reported decreased capacity of obese adipocytes to synthesize PGE<sub>2</sub> *ex vivo*.

The extent of obesity and potentially the synthesis of PGs could be affected by the composition of the high fat diet administered to the animals. In this study, lard was the source of fat in the high fat diet and, as such, the composition of the diet was mainly long-chain monounsaturated and saturated fatty acids. A recent paper by Buettner et al. compared different high fat diets administered to male Wistar rats and concluded that lard-based high fat diet models are suitable to study obesity and insulin resistance (36). The lard-based high fat diet significantly affected the plasma levels of free fatty acids, increasing oleic (monounsaturated) and stearic (saturated) acid, and decreasing linoleic ( $\omega$ -6 polyunsaturated) and linolenic ( $\omega$ -3 polyunsaturated) acid (36). Lowering the levels of linoleic acid, which is the natural precursor of arachidonic acid, could potentially lead to a decreased availability of arachidonic acid for PG synthesis, but the level of arachidonic acid was found not to differ significantly between animals fed the lard-based high fat diet and those on regular chow (36). However, the mechanism by which PGE<sub>2</sub> levels and expression of mPGES-1 are reduced by the high fat diet is unknown and the effect of dietary fatty acids on the regulation of PGE<sub>2</sub> synthesis deserve to be further characterized.

The mPGES-1 is an inducible enzyme (23,26,37). Previous studies reported low or undetectable basal levels of mPGES-1 RNA in several rat (37,38) and human (26) tissues although some basal mPGES-1 protein expression has been detected in mice lung, spleen, kidney, and stomach (34). The much higher level of mPGES-1 protein expression in WAT compared to other tissues possibly reflects the importance of this enzyme and of PGE<sub>2</sub> in regulating adipocyte or WAT biological processes. However, further studies would be required to elucidate the role of mPGES-1 in WAT tissue *in vivo* and to determine the potential effects of pharmacological modulation of mPGES-1 activity or PGE<sub>2</sub> signalling on WAT metabolism. Interestingly, mPGES-1 expression was consistently higher (3- to 4-fold) in lean epididymal compared to lean inguinal WAT, which suggests that there exists a depot-dependent regulation of mPGES-1 expression.

The mPGES-1 protein was detected both in undifferentiated and differentiated mouse 3T3-L1 adipocytes, and the expression of mPGES-1 was also detected at all stages of adipogenesis in isolated human primary subcutaneous preadipocytes. The data obtained from these two independent cell systems show that mPGES-1 is expressed in adipocytes of both mice and humans. However, our results differ from those of Xie et al. who recently described an increase of mPGES-1 protein expression (compared to actin) during differentiation of mouse 3T3-L1 adipocytes (39). The explanation for this discrepancy is unknown and the role of mPGES-1 activity during adipocyte differentiation remains to be investigated. Nonetheless, the data of Xie et al. is in agreement with our results showing that mPGES-1 is expressed both in preadipocytes and in mature adipocytes.

Analysis of the expression of the three major PGE<sub>2</sub> synthases in lean and obese fat revealed a pronounced and selective decrease of mPGES-1 protein expression in both visceral and subcutaneous WAT depots during diet-induced obesity. The mPGES-1 expression has been shown to be down-regulated by dexamethasone (38,40) and phenobarbital (41,42), but, to our knowledge, this is the first report of an *in vivo* drug-independent down-regulation of mPGES-1. The amplitude of modulation for mPGES-1 expression in obesity was much greater than that of the two other PGE<sub>2</sub> synthases. Nevertheless, mPGES-2 and cPGES expression in epididymal WAT was significantly elevated in obese tissues, possibly reflecting a partial compensation for the decrease of mPGES-1. Partial compensation by mPGES-2 in myometrium of mPGES-1 deficient mice has previously been reported in a LPS preterm delivery model (43).

PGE<sub>2</sub> is a well known potent antilipolytic agent *in vitro* (12-14) and inhibits catecholamine-induced lipolysis in the nanomolar range (16,17). Neuronal or hormonal activation of lipolysis stimulates the release of prostaglandins from WAT (44), which have been proposed to be part of a negative feedback mechanism that controls lipolysis (16). However, the endogenous regulation of lipolysis by PGE<sub>2</sub> has not been conclusively demonstrated since the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on lipolysis are inconsistent. In fact, WAT produces mainly PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub>, which potently inhibit and stimulate lipolysis, respectively (14,15), and the production of both these PGs is inhibited by NSAIDs. Some studies report stimulation (45) or no effect (46,47) of NSAIDs on agonist-induced lipolysis. Nonetheless, a selective modulation of PG levels in WAT has the potential to affect lipolytic responses of



adipocytes and, in such, the down-regulation of mPGES-1 in obese WAT could potentially contribute to the increased lipolytic activity associated with obesity. Moreover, different PGs have been shown to differentially regulate adipogenesis *in vitro*. PGF<sub>2α</sub> has been shown to inhibit differentiation of 3T3-L1, 3T3-F442A, Ob1771, and rat primary preadipocytes (48,49). In contrast, carbacyclin, a stable analogue of PGI<sub>2</sub>, has been shown to stimulate Ob1771 preadipocyte differentiation (50). Of interest, PGE<sub>2</sub> has been shown to inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via its interaction with the EP4 receptor (20). The net effects of PGs on adipogenesis are not completely understood as arachidonic acid has been shown to either promote (49,51) or inhibit (52) adipocyte differentiation *in vitro* and appears to vary on cellular cAMP levels (52). The role of PGs in adipogenesis regulation *in vivo* remains to be established, but if PGE<sub>2</sub> negatively modulates adipocyte differentiation, the down-regulation of mPGES-1 could contribute to the increased adipogenesis caused by high fat feeding.

In summary, the observed decreases in mPGES-1 protein expression and PGE<sub>2</sub> levels in obese WAT might potentially contribute to the changes in lipolysis and adipogenesis regulation associated with diet-induced obesity.

**Acknowledgements**

The authors would like to thank S. Desmarais (Merck Frosst) for providing the 3T3-L1 samples, M. Ouellet and K. Bateman (Merck Frosst) for technical advice and support for the LC-MS analysis, as well as D. Normandin, S. Wong, and the Comparative Medicine Department staff (Merck Frosst) for animal procedures. This work was supported in part by studentships (P.-O. H.) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from the Department of Biochemistry at the Université de Montréal.

**References**

- (1) **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.** Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003;112:1796-1808.
- (2) **Clement K, Viguierie N, Poitou C, et al.** Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J.* 2004;18:1657-1669.
- (3) **Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al.** Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 2005;46:2347-2355.
- (4) **Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al.** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2003;112:1821-1830.
- (5) **Trayhurn P, Wood IS.** Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem. Soc. Trans.* 2005;33:1078-1081.

- (6) **Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, Lolmede K, Miranville A, Busse R.** Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2005;8:347-354.
- (7) **Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS.** Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature.* 1997;389:610-614.
- (8) **Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al.** Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I $\kappa$ B $\beta$ . *Science.* 2001;293:1673-1677.
- (9) **Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW.** Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 2004;145:2273-2282.
- (10) **Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM.** Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1995;95:2409-2415.
- (11) **Yudkin JS.** Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003;27 Suppl 3:S25-S28.

- (12) **Steinberg D, Vaughan M, Nestel PJ, Strand O, Bergstroem S.** Effects of the prostaglandins on hormone-induced mobilization of free fatty acids. *J. Clin. Invest.* 1964;43:1533-1540.
- (13) **Kather H.** Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on adenylate cyclase activity and lipolysis in human adipose tissue. *Int. J. Obes.* 1981;5:659-663.
- (14) **Richelsen B.** Release and effects of prostaglandins in adipose tissue. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 1992;47:171-182.
- (15) **Chatzipanteli K, Rudolph S, Axelrod L.** Coordinate control of lipolysis by prostaglandin E<sub>2</sub> and prostacyclin in rat adipose tissue. *Diabetes.* 1992;41:927-935.
- (16) **Richelsen B, Pedersen SB.** Antilipolytic effect of prostaglandin E<sub>2</sub> in perfused rat adipocytes. *Endocrinology.* 1987;121:1221-1226.
- (17) **Richelsen B, Pedersen SB, Moller-Pedersen T, Bak JF.** Regional differences in triglyceride breakdown in human adipose tissue: effects of catecholamines, insulin, and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Metabolism.* 1991;40:990-996.

- (18) **Kather H.** Inhibition of hormone-stimulated human fat cell-lipolysis by prostaglandin E<sub>2</sub> and its synthetic analogue sulprostrone. *Prostaglandins Leukot. Med.* 1982;8:525-529.
- (19) **Strong P, Coleman RA, Humphrey PP.** Prostanoid-induced inhibition of lipolysis in rat isolated adipocytes: probable involvement of EP3 receptors. *Prostaglandins.* 1992;43:559-566.
- (20) **Tsuboi H, Sugimoto Y, Kainoh T, Ichikawa A.** Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;322:1066-1072.
- (21) **Funk CD.** Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001;294:1871-1875.
- (22) **Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 1996;271:33157-33160.
- (23) **Claveau D, Sirinyan M, Guay J, et al.** Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a major terminal synthase that is selectively up-regulated during cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> production in the rat adjuvant-induced arthritis model. *J. Immunol.* 2003;170:4738-4744.

- (24) **Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, et al.** Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:9044-9049.
- (25) **Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F.** Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 1999;79:1193-1226.
- (26) **Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B.** Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96:7220-7225.
- (27) **Ouellet M, Falguyret JP, Ear PH, et al.** Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin E synthase-1. *Protein Expr. Purif.* 2002;26:489-495.
- (28) **Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, et al.** Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;291:884-889.
- (29) **Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I.** Molecular identification of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that is functionally coupled

with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 2000;275:32775-32782.

- (30) **Murakami M, Nakashima K, Kamei D, et al.** Cellular prostaglandin E<sub>2</sub> production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 2003;278:37937-37947.
- (31) **Fahmi H.** mPGES-1 as a novel target for arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2004;16:623-627.
- (32) **Gaskins HR, Hausman DB, Martin RJ, Hausman GJ.** Evidence for abnormal prostaglandin synthesis in obese Zucker rat adipose cell cultures. *J. Nutr.* 1989;119:458-462.
- (33) **Guay J, Bateman K, Gordon R, Mancini J, Riendeau D.** Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-1. *J. Biol. Chem.* 2004;279:24866-24872.
- (34) **Boulet L, Ouellet M, Bateman KP, et al.** Deletion of microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthase-1 reduces inducible and basal PGE<sub>2</sub> production and alters the gastric prostanoid profile. *J. Biol. Chem.* 2004;279:23229-23237.



- (35) **Soni KG, Lehner R, Metalnikov P, et al.** Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase. *J. Biol. Chem.* 2004;279:40683-40689.
- (36) **Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, et al.** Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J. Mol. Endocrinol.* 2006;36:485-501.
- (37) **Mancini JA, Blood K, Guay J, et al.** Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J. Biol. Chem.* 2001;276:4469-4475.
- (38) **Murakami M, Naraba H, Tanioka T, et al.** Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 2000;275:32783-32792.
- (39) **Xie Y, Kang X, Ackerman WE, et al.** Differentiation-dependent regulation of the cyclooxygenase cascade during adipogenesis suggests a complex role for prostaglandins. *Diabetes Obes. Metab.* 2006;8:83-93.
- (40) **Thoren S, Jakobsson PJ.** Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C<sub>4</sub>. *Eur. J. Biochem.* 2000;267:6428-6434.

- (41) **Forsberg L, Leeb L, Thoren S, Morgenstern R, Jakobsson P.** Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett.* 2000;471:78-82.
- (42) **Ekstrom L, Lyrenas L, Jakobsson PJ, Morgenstern R, Kelner MJ.** Basal expression of the human MAPEG members microsomal glutathione transferase 1 and prostaglandin E synthase genes is mediated by Sp1 and Sp3. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003;1627:79-84.
- (43) **Kubota K, Kubota T, Kamei D, et al.** Change in prostaglandin E synthases (PGESs) in microsomal PGES-1 knockout mice in a preterm delivery model. *J. Endocrinol.* 2005;187:339-345.
- (44) **Shaw JE, Ramwell PW.** Release of prostaglandin from rat epididymal fat pad on nervous and hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* 1968;243:1498-1503.
- (45) **Illiano G, Cuatrecasas P.** Endogenous prostaglandins modulate lipolytic processes in adipose tissue. *Nat. New Biol.* 1971;234:72-74.
- (46) **Dalton C, Hope HR.** Inability of prostaglandin synthesis inhibitors to affect adipose tissue lipolysis. *Prostaglandins.* 1973;4:641-651.

- (47) **Fain JN, Psychoyos S, Czernik AJ, Frost S, Cash WD.** Indomethacin, lipolysis, and cyclic AMP accumulation in white fat cells. *Endocrinology*. 1973;93:632-639.
- (48) **Casimir DA, Miller CW, Ntambi JM.** Preadipocyte differentiation blocked by prostaglandin stimulation of prostanoid FP2 receptor in murine 3T3-L1 cells. *Differentiation*. 1996;60:203-210.
- (49) **Gaillard D, Negrel R, Lagarde M, Ailhaud G.** Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochem. J*. 1989;257:389-397.
- (50) **Negrel R, Gaillard D, Ailhaud G.** Prostacyclin as a potent effector of adipose-cell differentiation. *Biochem. J*. 1989;257:399-405.
- (51) **Catalioto RM, Gaillard D, Maclouf J, Ailhaud G, Negrel R.** Autocrine control of adipose cell differentiation by prostacyclin and PGF<sub>2</sub> alpha. *Biochim. Biophys. Acta*. 1991;1091:364-369.
- (52) **Petersen RK, Jorgensen C, Rustan AC, et al.** Arachidonic acid-dependent inhibition of adipocyte differentiation requires PKA activity and is associated with sustained expression of cyclooxygenases. *J. Lipid Res*. 2003;44:2320-2330.

**Tables**Table 1. PGE<sub>2</sub> Levels in Inguinal WAT of Lean and Obese Animals.

	Lean	Obese
Animal weight (g)	31.6 ± 0.2	44.0 ± 0.5 *
<b>Inguinal WAT</b>		
- Tissue weight (mg)	174 ± 58	736 ± 40 *
- PGE <sub>2</sub> level (pg/mg tissue)	1.28 ± 0.24	0.29 ± 0.03 *
- PGE <sub>2</sub> level (pg/mg protein)	210.6 ± 22.7	74.2 ± 9.5 *

Levels of PGE<sub>2</sub> were quantified by LC-MS in inguinal WAT of lean and obese mice.

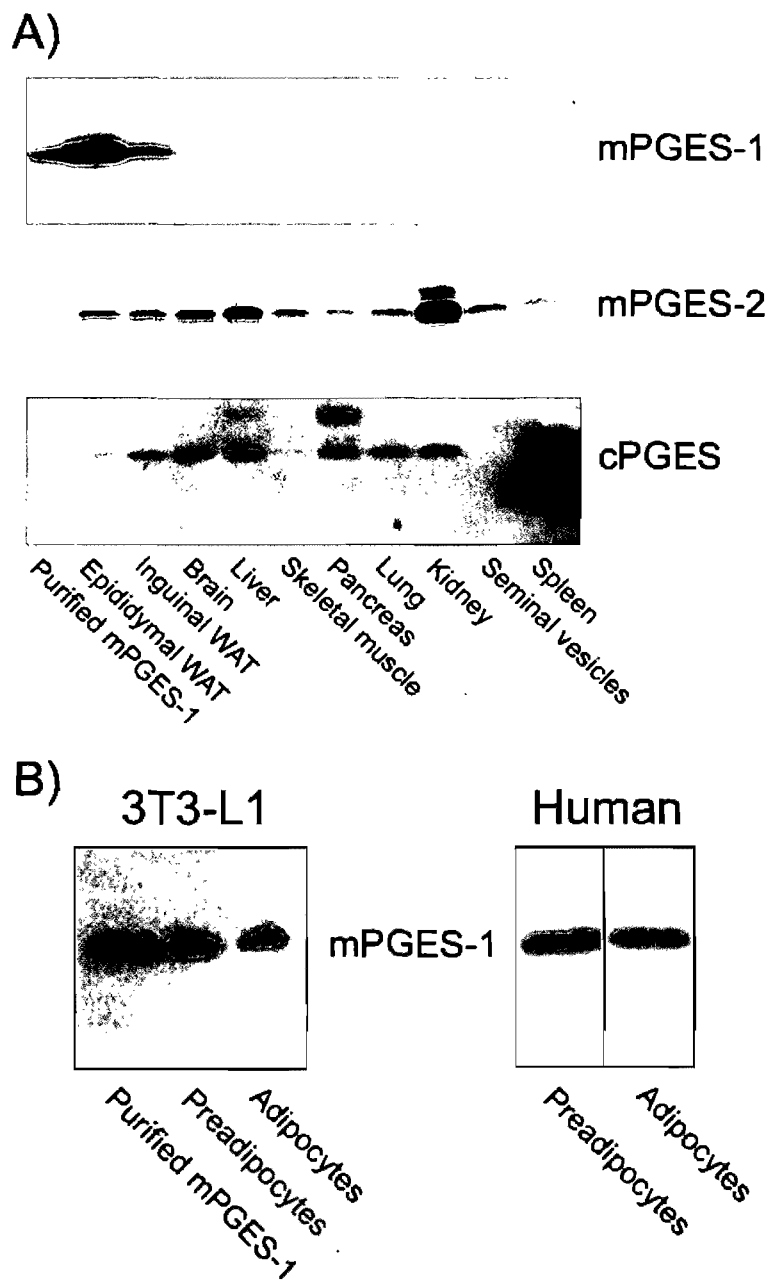
Values are expressed as mean ± SEM of n=5 animals per group. \*,  $p < 0.05$ .

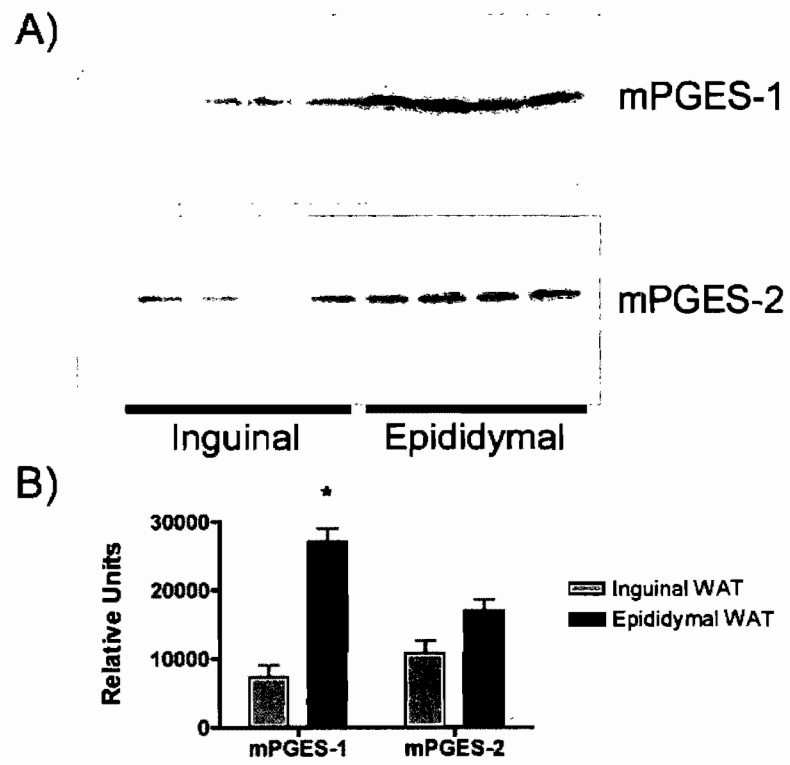
**Figure legends**

Fig. 1. Expression of mPGES-1 in Preadipocytes, Adipocytes, and Whole WAT. (A) Mouse WAT contains high levels of mPGES-1 as compared to other tissues. Equal amounts of protein (30  $\mu$ g) from total tissue homogenates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted for the detection of mPGES-1 (17 kDa), mPGES-2 (33 kDa), and cPGES (21 kDa). The three PGE<sub>2</sub> synthases were consecutively detected on the same blot by stripping the membrane between each detection. Purified human mPGES-1 (0.4 ng) was used as control. The distribution of the PGE<sub>2</sub> synthases is representative of that observed for 3 different animals. (B) The mPGES-1 is expressed in preadipocytes and mature adipocytes. Mouse 3T3-L1 and human primary subcutaneous preadipocytes were differentiated into adipocytes in culture and the expression of mPGES-1 in homogenates (30  $\mu$ g and 4  $\mu$ g of protein for 3T3-L1 and human primary cells, respectively) was measured by SDS-PAGE and immunoblotting.

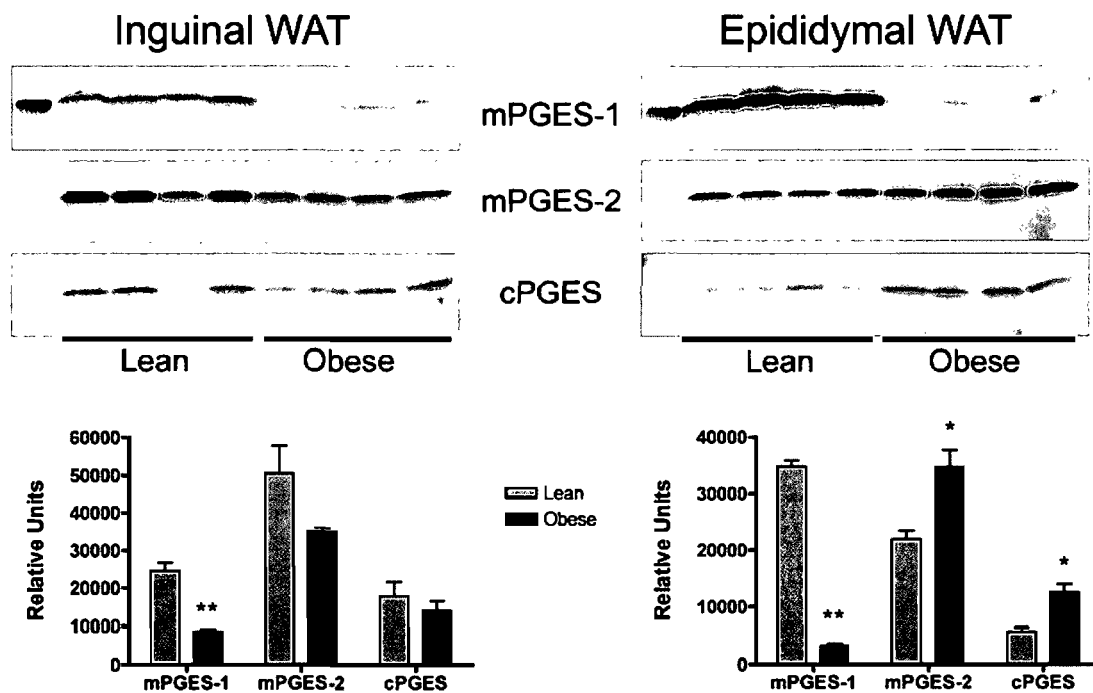
Fig. 2. The Expression of mPGES-1 Protein in WAT is Dependent on Fat Depot. (A) Expression of mPGES-1 and mPGES-2 in epididymal and inguinal WAT homogenates. Equal amounts of protein (15  $\mu$ g) from total WAT homogenates of 4 different lean mice were analyzed by SDS-PAGE and western blotting. The first lane is 0.4 ng of purified human mPGES-1. (B) Densitometric quantification of the intensity of the immunoreactive bands (mean  $\pm$  SEM, n=4). \* Comparison between inguinal and epididymal WAT shows a significant difference for mPGES-1 ( $p < 0.05$ ).

Fig. 3. Decrease in the Expression of mPGES-1 in Epididymal and Inguinal WAT During Diet-induced Obesity in Mice. (A) Six week old C57Bl/6 mice were subjected to either high fat diet or regular diet for 12 weeks after which the expression of mPGES-1, mPGES-2, and cPGES in WAT homogenates (15  $\mu$ g of protein) was analyzed by SDS-PAGE and western blotting. The first lane is 0.4 ng of purified human mPGES-1. (B) The relative intensities of the immunoreactive bands were quantified by densitometric analysis for each group (mean  $\pm$  SEM, n=4). Significant differences between lean and obese tissues are indicated (\*,  $p < 0.05$ ).

**Figure 1**

**Figure 2**



**Figure 3**

**TROISIÈME PARTIE:**

**DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

## **CHAPITRE 10. DISCUSSION**

Dans l'ensemble, nos données démontrent que la COX-2 et la mPGES-1 peuvent toutes deux contribuer à la synthèse basale de prostanoïdes dans certains tissus particuliers où elles sont exprimées de façon significative en absence d'inflammation provoquée. La COX-2 peut contribuer à chacune des voies de synthèse des prostaglandines E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub>, prostacycline et thromboxane. De plus, aucune évidence d'une interaction préférentielle entre la COX-2 et la mPGES-1 ou la PGIS n'a été trouvée.

### **10.1. Structures de la mPGES-1 et de la COX-2**

Un analogue photo-activable de la méthionine servant à étudier les interactions protéine-protéine a récemment été décrit [397]. Il a été démontré que cette photo-méthionine (photo-Met) est incorporée dans les protéines par la machinerie traductionnelle des cellules et que son activation par les rayons UV génère un carbène réactif qui réagit rapidement avec les molécules avoisinantes pour former un lien covalent. Les complexes protéine-protéine sont ensuite détectés en effectuant un immunobuvardage envers une protéine spécifique. Cette nouvelle technique a été utilisée avec succès pour détecter une interaction entre deux protéines membranaires, Insig-1 et PGRMC1 [397]. Cependant, l'analyse des complexes formés par cette méthode est limitée par une efficacité de pontage relativement faible, générant donc une quantité infime de matériel, insuffisante pour une éventuelle caractérisation par d'autres approches que celle de l'immunobuvardage, telles la spectrométrie de masse ou le microséquençage.

Néanmoins, nous avons été en mesure d'utiliser la photo-Met pour mettre en évidence certaines interactions protéine-protéine de la COX-2 et de la mPGES-1. Une recherche des citations de l'article original montre qu'il s'agit d'une des premières applications de cette nouvelle technique depuis sa description. De plus, nous montrons que la photo-Met peut être utilisée non seulement pour l'étude des interactions entre différentes protéines, mais aussi pour caractériser la structure oligomérique des protéines membranaires dans des cellules intactes. Nous montrons aussi que cette approche permet de détecter des changements conformationnels d'une protéine suite à la liaison d'une petite molécule telle un inhibiteur.

Par cette approche, nous avons détecté un seul complexe de plus haut poids moléculaire pour COX-2, en accord avec la structure dimérique de l'enzyme purifiée telle que déterminée par cristallographie et diffraction des rayons X [205,206]. Par contre, nos données ont été obtenues à partir de cellules intactes, ce qui démontre que la COX-2 existe aussi sous forme dimérique dans l'environnement membranaire de la cellule.

Pour mPGES-1, nous avons détecté plusieurs complexes de plus haut poids moléculaire et nous proposons que ces complexes correspondent à une structure homotrimérique de la mPGES-1. La structure détaillée de la mPGES-1 n'a pas encore été déterminée, mais des études de cristallographie et de diffraction des électrons suggèrent que cette enzyme forme un homotrimère [248]. De plus, les structures de la mGST-1, de la FLAP et de la LTC<sub>4</sub>S, trois autres membres de la famille des MAPEG, ont été élucidées par cristallographie et diffraction des électrons (mGST-1) [253] ou des rayons X (FLAP et LTC<sub>4</sub>S) [254-256]. Toutes ces enzymes existent sous forme

d'homotrimères. Les protéines membres de la famille des MAPEG possèdent des séquences et des profils d'hydropathie similaires [128]. De plus, les structures tridimensionnelles de la mGST-1, de la FLAP et de la LTC<sub>4</sub>S sont comparables. En somme, les données préliminaires sur la mPGES-1 et les similarités de structure entre les protéines membres de la famille de MAPEG suggèrent que la mPGES-1 existe probablement aussi sous forme trimérique, et nos résultats suggèrent que cette forme est aussi présente dans les cellules intactes.

Finalement, la sensibilité de la méthode de photo-pontage avec l'analogue de la méthionine nous a permis de détecter un changement de conformation induit par la liaison d'un inhibiteur sélectif à la mPGES-1. L'analyse des structures tridimensionnelles de FLAP et de LTC<sub>4</sub>S a montré que ces enzymes forment des homotrimères avec des domaines fonctionnels à l'interface des sous-unités [254-256]. Les sites actifs de la LTC<sub>4</sub>S, comprenant les sites de liaisons du substrat et du glutathion, sont situés à l'interface des sous-unités du trimère [255,256]. Dans le cas de la FLAP, les inhibiteurs se lient dans des sillons hydrophobes correspondant aux sites actifs de la LTC<sub>4</sub>S [254]. Par ailleurs, il existe une similarité de séquence entre la FLAP et la mPGES-1 dans les régions impliquées dans la liaison des inhibiteurs [218] et certains inhibiteurs de la FLAP inhibent aussi la mPGES-1 [382]. Ces données nous permettent de proposer que les inhibiteurs de la mPGES-1 se lient aussi à l'interface entre les sous-unités du trimère, entraînant un changement de conformation qui serait responsable de la réduction du photo-pontage que nous avons observée.

## 10.2. Couplage entre la COX-2 et la mPGES-1

L'existence d'un couplage fonctionnel entre la mPGES-1 et la COX-2 a été proposée à partir d'études de co-transfection de la mPGES-1 avec COX-1 ou COX-2 dans des cellules HEK293 [252]. Dans ces conditions, les cellules HEK293 transfectées avec la mPGES-1 produisent plus de PGE<sub>2</sub> en présence de COX-2 qu'en présence de COX-1 suite à une stimulation avec de l'IL-1 $\beta$  ou un ionophore du Ca<sup>2+</sup>. Cependant, l'interprétation des résultats de ces études de co-transfections est compliquée par les différences catalytiques entre la COX-1 et la COX-2. En effet, la COX-2 est plus efficace que la COX-1 pour convertir de faibles concentrations d'acide arachidonique en PGH<sub>2</sub> [200,201] et elle nécessite moins de peroxyde pour amorcer son cycle catalytique [199]. De plus, en co-transfectant COX-1 ou COX-2 avec la cPLA<sub>2</sub> dans des cellules HEK293, il a été démontré que la COX-2 est plus efficace que la COX-1 pour utiliser l'acide arachidonique libéré par la cPLA<sub>2</sub> dans des cellules stimulées avec un ionophore du Ca<sup>2+</sup> ou de l'IL-1 $\beta$  [388]. La quantité de substrat disponible pour la mPGES-1 est donc vraisemblablement plus grande en présence de la COX-2 qu'en présence de la COX-1, ce qui pourrait donner lieu à une fausse apparence de couplage préférentiel avec la COX-2. Néanmoins, nous avons tenté de détecter une interaction directe entre la COX-2 et la mPGES-1 dans des cellules intactes par photo-pontage. Nous n'avons obtenu aucune évidence de l'existence d'une interaction entre la COX-2 et la mPGES-1 dans des cultures de cellules épithéliales humaines, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'interaction directe entre ces deux enzymes ou que les techniques employées ne permettent pas de détecter une telle interaction.

Le couplage apparent entre la COX-2 et la mPGES-1 pourrait refléter simplement les propriétés catalytiques différentes des deux cyclo-oxygénases. D'ailleurs, lorsque la disponibilité de l'acide arachidonique n'est pas limitante, la mPGES-1 est toute aussi efficace à synthétiser de la PGE<sub>2</sub> à partir de la COX-1 que de la COX-2 [252]. D'un autre côté, le couplage fonctionnel entre la COX-2 et la mPGES-1 pourrait s'expliquer par une co-induction des deux enzymes. En effet, la COX-2 et la mPGES-1 sont toutes deux induites dans plusieurs modèles d'inflammation *in vitro* [260-262] et *in vivo* [46,47,263]. Par contre, il est à noter que dans plusieurs cas les inductions de la COX-2 et de la mPGES-1 ne sont pas coordonnées dans le temps, le maximum d'expression de la COX-2 précédant celui de la mPGES-1 [261,263]. De plus, il a été démontré que la production cellulaire de PGE<sub>2</sub> par la mPGES-1 pouvait s'effectuer via l'activité de la COX-1 en plus de la COX-2 [389,390]. Aussi, puisque la COX-1 est principalement responsable de la synthèse des prostanoïdes dans la muqueuse gastrique et que les niveaux de PGE<sub>2</sub> dans l'estomac de souris mPGES-1<sup>-/-</sup> sont significativement diminués par rapport à ceux de souris normales [257], il est clair que la mPGES-1 peut convertir la PGH<sub>2</sub> produite par COX-1 *in vivo*.

### 10.3. Couplage entre la COX-2 et la PGIS

Tout comme pour la mPGES-1, l'existence d'un couplage préférentiel entre la PGIS et la COX-2 a été proposée par des études de co-transfection de la PGIS avec COX-1 ou COX-2 [391]. L'interprétation des résultats de ces études est donc sujette aux mêmes critiques que dans le cas de la mPGES-1. Dans divers autres modèles, des cellules ont été stimulées avec des cytokines ou du LPS et une augmentation sélective

de la production de PGI<sub>2</sub> et de PGE<sub>2</sub> par rapport aux autres PG a été observée [392,393]. L'augmentation de la synthèse de PGI<sub>2</sub> et de PGE<sub>2</sub> dans ces conditions est dépendante de l'induction de la COX-2, souvent avec une induction parallèle de la PGIS et de la mPGES-1 [393]. L'apparent couplage préférentiel entre la PGIS et la COX-2 dans ces modèles cellulaires semble donc dépendre d'avantage d'une co-induction des deux enzymes que d'un couplage protéine-protéine.

Nous avons toutefois caractérisé la relation entre la PGIS et la COX-2 en étudiant la co-localisation de ces deux enzymes dans l'endothélium vasculaire normal. Nos résultats montrent que la PGIS est co-localisée principalement avec la COX-1 dans l'endothélium aortique de trois espèces différentes (humain, chien et rat) et ne supportent donc pas l'idée d'un couplage préférentiel entre la COX-2 et la PGIS dans ce tissu (co-localisation de la PGIS avec COX-2: 3%; avec COX-1: 19%). Ces données sont en accord avec beaucoup d'études qui ont démontré que les tissus vasculaires normaux expriment abondamment la COX-1 mais peu ou pas la COX-2 [376-378]. De plus, nos résultats montrent que la COX-2 n'est pas exprimée de façon plus importante dans l'endothélium vasculaire aux endroits où la force de cisaillement est plus forte, ce qui ne supporte pas la proposition que la COX-2 soit induite par la force de cisaillement *in vivo*, contrairement aux observations faites dans les cellules en culture [374]. La COX-2 et la PGIS ne sont donc pas associées de façon préférentielle dans l'endothélium aortique. Un rôle de la COX-2 dans la synthèse vasculaire de prostacycline a été proposé pour expliquer les effets secondaires cardiovasculaires associés à l'administration chronique de coxibs [370,398]. En effet, la COX-2 des cellules endothéliales en culture est induite *in vitro* par la force de cisaillement causée par un



flux laminaire, ce qui a mené à la suggestion qu'elle pourrait être l'isoforme responsable de la synthèse de prostacycline dans l'endothélium *in vivo* en condition physiologique [370,374]. De plus, les coxibs inhibent l'excrétion des métabolites urinaires de la prostacycline et n'affectent pas l'excrétion des métabolites du thromboxane chez des sujets normaux [236,371,372]. Puisque l'endothélium vasculaire est une riche source de PGIS et qu'il synthétise une grande quantité de prostacycline, il a été proposé que l'excrétion urinaire des métabolites de la prostacycline (en particulier la 2,3-dinor-6-céto-PGF<sub>1α</sub>) reflète la synthèse vasculaire de prostacycline [236,372]. Ces données semblent indiquer que la COX-2 joue un rôle dans la synthèse de prostacycline dans le système vasculaire. Ainsi, une diminution de la synthèse vasculaire de la prostacycline vaso-protectrice par l'inhibition de la COX-2 pourrait représenter une explication plausible des effets secondaires cardiovasculaires des coxibs. Cependant, le rôle de la COX-2 dans la synthèse constitutive de la prostacycline dans les vaisseaux sanguins demeure controversé. Tout d'abord, il est impossible de déterminer précisément l'origine tissulaire des métabolites urinaires de la prostacycline [373]. De plus, nos résultats de co-localisation de la PGIS avec la COX-1 et la COX-2 dans l'endothélium vasculaire montrent que la COX-2 n'est pas exprimée de façon significative dans l'aorte, même aux endroits où la force de cisaillement causée par l'afflux sanguin est plus élevée. Ces données sont en accord avec plusieurs autres études qui démontrent que la COX-2 dans le système vasculaire est presque uniquement détectée dans des tissus athérosclérotiques ou endommagés et non dans des tissus normaux [376-378], à l'exception de l'endothélium de chien où de faibles niveaux de COX-2 ont été détectés par immunohistochimie (voir chapitre 7 et [399]). Finalement, nos résultats montrent

que les niveaux de 6-céto-PGF<sub>1α</sub> dans l'aorte de rats sont diminués par l'administration d'un inhibiteur sélectif de la COX-1 et non par un inhibiteur sélectif de la COX-2. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la COX-2 n'est pas impliquée de façon significative dans la synthèse vasculaire de prostacycline par l'endothélium vasculaire normal, ce qui suggère de surcroît que la diminution de l'excrétion urinaire des métabolites de prostacycline par les coxibs ne peut pas être expliquée par une inhibition de la synthèse vasculaire de prostacycline.

Cependant, nos données montrent aussi que la PGIS est grandement co-localisée avec la COX-2 dans l'épithélium bronchiolaire. Donc, d'autres tissus où la COX-2 et la PGIS sont co-exprimées, tels les poumons ou les reins, pourraient être responsables de la synthèse systémique de prostacycline par la COX-2. Par conséquent, l'inhibition de l'excrétion des métabolites urinaires de la prostacycline par les coxibs pourrait être due à l'inhibition de la COX-2 dans d'autres tissus que les vaisseaux sanguins.

En somme, les données obtenues sur le couplage entre la COX-2 et la mPGES-1 ou la PGIS *in vitro* en culture cellulaire ne peuvent donc pas être directement extrapolées aux tissus *in vivo*. Bien qu'il puisse y avoir une apparence d'association préférentielle entre l'activité de ces prostaglandines synthases et celle de la COX-2 dans certaines conditions, la synthèse cellulaire des prostanoides est probablement davantage régulée par les niveaux d'expression des différentes enzymes de la voie de synthèse des prostanoides ainsi que par la quantité d'acide arachidonique disponible que par un couplage fonctionnel entre les enzymes.

#### 10.4. Synthèse constitutive de prostaglandines par la COX-2 et la mPGES-1

Il a été démontré que la COX-2 est exprimée en absence d'inflammation dans quelques tissus, tels le cerveau, les reins et les poumons. De plus, la COX-2 est nécessairement catalytiquement active dans certains tissus puisque l'administration de coxibs diminue d'environ 60% l'excrétion urinaire des métabolites de la prostacycline [236,371,372] et de la PGE<sub>2</sub> [400]. Cependant, le niveau d'activité de la COX-2 et son éventuelle contribution à la synthèse des différents prostanoïdes dans les tissus où elle est constitutivement exprimée ne sont pas connus. Nous avons donc étendu à d'autres tissus notre caractérisation de la contribution de la COX-2 à la synthèse constitutive des prostanoïdes. Les niveaux tissulaires des prostanoïdes majeurs ont été mesurés chez des rats traités avec un inhibiteur sélectif de la COX-1 ou un inhibiteur sélectif de la COX-2 et ont été comparés aux niveaux des tissus de rats contrôles. Nos résultats montrent que la COX-1 joue un rôle significatif dans la synthèse constitutive des prostanoïdes dans tous les tissus examinés, ce qui est en accord avec le rôle majeur de cette isoforme dans la synthèse des prostanoïdes requis pour la régulation des processus homéostatiques [186]. Par contre, nos résultats indiquent que la COX-2 n'est pas impliquée dans la synthèse constitutive des prostanoïdes dans la majorité des tissus sélectionnés, à l'exception des reins et du cerveau, où l'expression de la COX-2 avait déjà été détectée [231,232]. Curieusement, l'administration d'un inhibiteur sélectif de la COX-2 n'affecte pas les niveaux de 6-céto-PGF<sub>1α</sub> dans les poumons, bien que la COX-2 soit exprimée dans ce tissu [233] et qu'elle y soit grandement co-localisée avec la PGIS, tel que montré dans notre étude de co-localisation de la PGIS avec COX-1/-2. Dans les reins et le cerveau, où la COX-2 est constitutivement exprimée, l'inhibition sélective de

la COX-2 entraîne une diminution des niveaux de toutes les prostanoïdes mesurées, à l'exception de la PGD<sub>2</sub> dans le cerveau. Les raisons qui expliquent le manque d'inhibition de la PGD<sub>2</sub> dans le cerveau ne sont pas connues, mais il est possible que cette prostaglandine ait une durée de vie plus longue dans ce tissu et qu'elle ne soit pas produite de façon significative durant le temps de traitement avec l'inhibiteur sélectif de COX-2. Somme toute, nos données suggèrent que la COX-2 n'est pas couplée de façon préférentielle à une prostanoïde synthase terminale particulière dans ces tissus.

En terminant, bien que la mPGES-1 soit mieux connue pour son rôle dans les réactions inflammatoires, l'observation de niveaux réduits de PGE<sub>2</sub> dans plusieurs tissus des souris mPGES-1<sup>-/-</sup> [257] démontre que cette enzyme joue aussi un rôle dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> *in vivo* en absence d'inflammation. Nous avons donc déterminé la distribution tissulaire de la mPGES-1 chez la souris dans le but de mieux caractériser son implication dans la synthèse constitutive de PGE<sub>2</sub>. La mPGES-1, tout comme la COX-2, est une enzyme inductible dont le niveau d'expression basal est faible ou non détectable dans la plupart des tissus [250]. Cependant, une expression constitutive de la mPGES-1 a été détectée dans certains tissus tels les poumons, les reins, la rate et l'estomac [257]. Nos résultats ont révélé que la mPGES-1 est fortement exprimée dans le tissu adipeux blanc des souris, de façon plus abondante dans le tissu viscéral par rapport au tissu sous-cutané. De plus, l'expression de la mPGES-1 dans ces deux types de tissu adipeux est beaucoup plus élevée que celle de plusieurs autres tissus, dont le rein, l'estomac et la rate, où le rôle de la mPGES-1 dans la synthèse de PGE<sub>2</sub> a été établi

[257]. Les niveaux élevés de  $PGE_2$  détectés dans le tissu adipeux sont donc probablement dus au haut niveau d'expression de la mPGES-1.

L'obésité est maintenant reconnue comme étant associée à une inflammation chronique de faible niveau. Puisque la mPGES-1 est une enzyme inductible par différents stimuli pro-inflammatoires, nous avons comparé les niveaux d'expression de la mPGES-1 et les niveaux de  $PGE_2$  dans le tissu adipeux de souris obèses par rapport à ceux des souris normales. Paradoxalement, nous avons observé une diminution des niveaux d'expression de la mPGES-1 et des niveaux de  $PGE_2$  dans le tissu adipeux des animaux obèses. Comparativement à la mPGES-1, les niveaux d'expression de la mPGES-2 et de la cPGES restent relativement inchangés, ce qui suggère encore que la mPGES-1 joue un rôle majeur dans la régulation de la synthèse de  $PGE_2$  dans le tissu adipeux. Puisque la  $PGE_2$  est un puissant agent anti-lipolytique *in vitro* [55,56] et qu'elle peut inhiber la différenciation des adipocytes en culture [401], la diminution de l'expression de la mPGES-1 et des niveaux de  $PGE_2$  dans le tissu adipeux des souris obèses pourrait potentiellement contribuer aux augmentations de la lipolyse basale et de l'adipogénèse associées au développement de l'obésité [402,403].

## CHAPITRE 11. CONCLUSION

Bien que les enzymes COX-2 et mPGES-1 soient considérées comme des protéines principalement inductibles et qu'elles soient faiblement exprimées en absence d'inflammation, l'ensemble des données présentées dans cette thèse démontre que la COX-2 et la mPGES-1 sont toutes deux impliquées dans la synthèse basale des prostanoïdes dans certains tissus ou types cellulaires particuliers.

En effet, nos travaux démontrent clairement que la COX-2 exprimée dans les reins et le cerveau d'animaux sains contribue de façon significative à la synthèse de toutes les prostanoïdes majeures dans ces tissus (sauf la PGD<sub>2</sub> dans le cerveau). Par contre, nos résultats démontrent aussi que la COX-2 ne joue pas un rôle quantitativement important dans la synthèse de prostanoïdes par l'endothélium aortique normal. Contrairement à l'hypothèse généralement admise pour expliquer les complications cardiovasculaires associées à l'administration chronique de coxibs, la synthèse vasculaire de prostacycline dépend donc majoritairement de la COX-1, et faiblement ou pas du tout de la COX-2. Par contre, la COX-2 est grandement co-localisée avec la PGIS dans l'épithélium bronchiolaire. Les relations entre la COX-2 et la PGIS varient donc d'un tissu à l'autre.

De la même manière, la mPGES-1 est constitutivement exprimée dans certains tissus, tels l'estomac, les reins et les poumons, où elle est en partie responsable de la synthèse de PGE<sub>2</sub> en absence d'inflammation [257]. Nos travaux ont révélé que la mPGES-1 est particulièrement abondante dans le tissu adipeux blanc et que ses niveaux d'expression sont diminués dans les tissus adipeux provenant d'animaux obèses par

rapport à ceux provenant d'animaux normaux. Les conséquences d'une telle diminution de la production de PGE<sub>2</sub> lors du développement de l'obésité demeurent inconnues, mais pourraient potentiellement contribuer aux changements dans la régulation de la lipolyse et de l'adipogénèse observés chez les gens souffrant d'obésité.

COX-2 est la cible des AINS et des coxibs tandis que la mPGES-1 représente une nouvelle cible thérapeutique pour laquelle la mise au point d'inhibiteurs sélectifs est présentement en cours. Cependant, nos résultats montrent qu'en plus de leur rôle majeur dans la synthèse des niveaux accrus de PGE<sub>2</sub> lors des réactions inflammatoires, la COX-2 et la mPGES-1 jouent aussi toutes deux un certain rôle dans la synthèse constitutive des prostanoïdes. Par conséquent, les bienfaits thérapeutiques de l'inhibition de ces enzymes sont à évaluer en tenant compte des répercussions potentielles sur la régulation des processus homéostatiques dans certains tissus.

## 12. PERSPECTIVES

En résumé, nos résultats indiquent que la COX-2 et la mPGES-1 participent toutes deux à la synthèse basale des prostanoïdes dans certains tissus en absence d'inflammation, notamment dans les reins, le cerveau et le tissu adipeux. Au niveau rénal, les prostanoïdes produites par COX-2 sont impliquées dans la régulation de l'excrétion des électrolytes et de l'eau et leur inhibition entraîne une rétention de fluide pouvant causer une augmentation de la pression artérielle. Dans les autres tissus, le rôle précis de la COX-2 et de la mPGES-1 n'est que peu défini. Pourtant, une connaissance approfondie des effets locaux des différentes prostanoïdes produites par COX-2 ou mPGES-1 dans les tissus normaux est nécessaire pour mieux comprendre les effets thérapeutiques et gérer les effets secondaires potentiels des AINS et des coxibs, surtout lorsqu'on sait que ces produits sont parmi les médicaments les plus consommés au monde. De plus, la synthèse locale des différentes prostanoïdes par COX-2 et les différentes prostanoïdes synthèses terminales est régulée de façon complexe complexe et elle varie en fonction du type et de l'état d'activation des cellules. Une analyse détaillée des variations des niveaux tissulaires des prostanoïdes majeures, ainsi que l'effet d'inhibiteurs spécifiques sur l'évolution de diverses conditions physiologiques et pathologiques seraient donc à envisager. De nouveaux inhibiteurs de la mPGES-1 efficaces *in vivo* sont maintenant disponibles. Ils permettront de différencier les effets résultants d'une inhibition sélective de la production de PGE<sub>2</sub> de ceux des AINS, qui causent l'inhibition de la synthèse de multiples prostanoïdes en plus de celle de la PGE<sub>2</sub>.



### **13. RÉFÉRENCES**

1. Cook, J.A. (2005) Eicosanoids. *Crit. Care Med.*, **33**:S488-S491.
2. Innis, S.M. (1993) Essential fatty acid requirements in human nutrition. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **71**:699-706.
3. Yamashita, A., Sugiura, T. et Waku, K. (1997) Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, **122**:1-16.
4. Funk, C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, **294**:1871-1875.
5. Breyer, R.M., Bagdassarian, C.K., Myers, S.A. et Breyer, M.D. (2001) Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**:661-690.
6. Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S. et Tominaga, M. (2005) Sensitization of TRPV1 by EP<sub>1</sub> and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol. Pain*, **1**:3.
7. Takeuchi, K., Aihara, E., Sasaki, Y., Nomura, Y. et Ise, F. (2006) Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E<sub>2</sub> and EP<sub>1</sub> receptors in acid-induced HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in stomach. *J. Physiol. Pharmacol.*, **57**:661-676.
8. Takeuchi, K., Aihara, E., Hayashi, M. et Sasaki, Y. (2005) Role of prostaglandin E receptor subtypes in gastroduodenal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion. *Med. Chem.*, **1**:395-403.
9. Watanabe, K., Kawamori, T., Nakatsugi, S., Ohta, T., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Ushikubi, F., Narumiya, S., Sugimura, T. et Wakabayashi, K. (1999) Role of the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>1</sub> in colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **59**:5093-5096.
10. Hebert, R.L., Jacobson, H.R. et Breyer, M.D. (1991) Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits sodium transport in rabbit cortical collecting duct by increasing intracellular calcium. *J. Clin. Invest.*, **87**:1992-1998.
11. Breyer, M.D. et Breyer, R.M. (2000) Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **279**:F12-F23.
12. Reinold, H., Ahmadi, S., Depner, U.B., Layh, B., Heindl, C., Hamza, M., Pahl, A., Brune, K., Narumiya, S., Muller, U. et Zeilhofer, H.U. (2005) Spinal inflammatory hyperalgesia is mediated by prostaglandin E receptors of the EP<sub>2</sub> subtype. *J. Clin. Invest.*, **115**:673-679.

13. Honda, T., Segi-Nishida, E., Miyachi, Y. et Narumiya, S. (2006) Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E<sub>2</sub>-EP<sub>2</sub>/EP<sub>4</sub> signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.*, **203**:325-335.
14. Yuhki, K., Ueno, A., Naraba, H., Kojima, F., Ushikubi, F., Narumiya, S. et Ohishi, S. (2004) Prostaglandin receptors EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, and IP mediate exudate formation in carrageenin-induced mouse pleurisy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**:1218-1224.
15. Hizaki, H., Segi, E., Sugimoto, Y., Hirose, M., Saji, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Noda, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S. et Ichikawa, A. (1999) Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**:10501-10506.
16. Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M. et Taketo, M.M. (2001) Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP<sub>2</sub> in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nat. Med.*, **7**:1048-1051.
17. Paralkar, V.M., Borovecki, F., Ke, H.Z., Cameron, K.O., Lefker, B., Grasser, W.A., Owen, T.A., Li, M., DaSilva-Jardine, P., Zhou, M., Dunn, R.L., Dumont, F., Korsmeyer, R., Krasney, P., Brown, T.A., Plowchalk, D., Vukicevic, S. et Thompson, D.D. (2003) An EP<sub>2</sub> receptor-selective prostaglandin E<sub>2</sub> agonist induces bone healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**:6736-6740.
18. Hosoi, M., Oka, T. et Hori, T. (1997) Prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype is involved in thermal hyperalgesia through its actions in the preoptic hypothalamus and the diagonal band of Broca in rats. *Pain*, **71**:303-311.
19. Ueno, A., Matsumoto, H., Naraba, H., Ikeda, Y., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. et Ohishi, S. (2001) Major roles of prostanoid receptors IP and EP(3) in endotoxin-induced enhancement of pain perception. *Biochem. Pharmacol.*, **62**:157-160.
20. Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., Tanaka, T., Yoshida, N. et Narumiya, S. (1998) Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub>. *Nature*, **395**:281-284.
21. Claudino, R.F., Kassuya, C.A., Ferreira, J. et Calixto, J.B. (2006) Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E<sub>2</sub>-induced mouse paw edema. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **318**:611-618.
22. Takeuchi, K., Ukawa, H., Kato, S., Furukawa, O., Araki, H., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Ushikubi, F. et Narumiya, S. (1999) Impaired duodenal bicarbonate secretion and mucosal integrity in mice lacking prostaglandin E-receptor subtype EP(3). *Gastroenterology*, **117**:1128-1135.

23. Sanchez-Alavez, M., Klein, I., Brownell, S.E., Tabarean, I.V., Davis, C.N., Conti, B. et Bartfai, T. (2007) Night eating and obesity in the EP<sub>3</sub>R-deficient mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**:3009-3014.
24. Amano, H., Hayashi, I., Endo, H., Kitasato, H., Yamashina, S., Maruyama, T., Kobayashi, M., Satoh, K., Narita, M., Sugimoto, Y., Murata, T., Yoshimura, H., Narumiya, S. et Majima, M. (2003) Host prostaglandin E(2)-EP<sub>3</sub> signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J. Exp. Med.*, **197**:221-232.
25. Mutoh, M., Watanabe, K., Kitamura, T., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., Ohuchida, S., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Sugimura, T. et Wakabayashi, K. (2002) Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **62**:28-32.
26. Yoshida, K., Oida, H., Kobayashi, T., Maruyama, T., Tanaka, M., Katayama, T., Yamaguchi, K., Segi, E., Tsuboyama, T., Matsushita, M., Ito, K., Ito, Y., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohuchida, S., Kondo, K., Nakamura, T. et Narumiya, S. (2002) Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP<sub>4</sub> receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**:4580-4585.
27. Machwate, M., Harada, S., Leu, C.T., Sedor, G., Labelle, M., Gallant, M., Hutchins, S., Lachance, N., Sawyer, N., Slipetz, D., Metters, K.M., Rodan, S.B., Young, R. et Rodan, G.A. (2001) Prostaglandin receptor EP(4) mediates the bone anabolic effects of PGE(2). *Mol. Pharmacol.*, **60**:36-41.
28. Lin, C.R., Amaya, F., Barrett, L., Wang, H., Takada, J., Samad, T.A. et Woolf, C.J. (2006) Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>4</sub> contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**:1096-1103.
29. Nakao, K., Murase, A., Ohshiro, H., Okumura, T., Taniguchi, K., Murata, Y., Masuda, M., Kato, T., Okumura, Y. et Takada, J. (2007) CJ-023,423, a novel, potent and selective prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor antagonist with antihyperalgesic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **322**:686-694.
30. Matsuoka, T., Hirata, M., Tanaka, H., Takahashi, Y., Murata, T., Kabashima, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Ushikubi, F., Aze, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Yoshida, N., Kimura, K., Mizoguchi, A., Honda, Y., Nagai, H. et Narumiya, S. (2000) Prostaglandin D<sub>2</sub> as a mediator of allergic asthma. *Science*, **287**:2013-2017.
31. Cheng, K., Wu, T.J., Wu, K.K., Sturino, C., Metters, K., Gottesdiener, K., Wright, S.D., Wang, Z., O'Neill, G., Lai, E. et Waters, M.G. (2006) Antagonism of the prostaglandin D<sub>2</sub> receptor 1 suppresses nicotinic acid-induced vasodilation in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**:6682-6687.

32. Huang, Z.L., Urade, Y. et Hayaishi, O. (2007) Prostaglandins and adenosine in the regulation of sleep and wakefulness. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **7**:33-38.
33. Hirai, H., Tanaka, K., Yoshie, O., Ogawa, K., Kenmotsu, K., Takamori, Y., Ichimasa, M., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S. et Nagata, K. (2001) Prostaglandin D<sub>2</sub> selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J. Exp. Med.*, **193**:255-261.
34. Satoh, T., Moroi, R., Aritake, K., Urade, Y., Kanai, Y., Sumi, K., Yokozeki, H., Hirai, H., Nagata, K., Hara, T., Utsuyama, M., Hirokawa, K., Sugamura, K., Nishioka, K. et Nakamura, M. (2006) Prostaglandin D<sub>2</sub> plays an essential role in chronic allergic inflammation of the skin via CRTH2 receptor. *J. Immunol.*, **177**:2621-2629.
35. Spik, I., Brenuchon, C., Angeli, V., Staumont, D., Fleury, S., Capron, M., Trottein, F. et Dombrowicz, D. (2005) Activation of the prostaglandin D<sub>2</sub> receptor DP<sub>2</sub>/CRTH2 increases allergic inflammation in mouse. *J. Immunol.*, **174**:3703-3708.
36. Cheng, Y., Austin, S.C., Rocca, B., Koller, B.H., Coffman, T.M., Grosser, T., Lawson, J.A. et FitzGerald, G.A. (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>. *Science*, **296**:539-541.
37. Ueno, A., Naraba, H., Ikeda, Y., Ushikubi, F., Murata, T., Narumiya, S. et Oh-ishi, S. (2000) Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw edema induced in IP-receptor-deficient mice. *Life Sci.*, **66**:L155-L160.
38. Murata, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Hirata, M., Yamasaki, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Aze, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., Ueno, A., Oh-ishi, S. et Narumiya, S. (1997) Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*, **388**:678-682.
39. Pulichino, A.M., Rowland, S., Wu, T., Clark, P., Xu, D., Mathieu, M.C., Riendeau, D. et Audoly, L.P. (2006) Prostacyclin antagonism reduces pain and inflammation in rodent models of hyperalgesia and chronic arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**:1043-1050.
40. Senior, J., Sangha, R., Baxter, G.S., Marshall, K. et Clayton, J.K. (1992) In vitro characterization of prostanoid FP-, DP-, IP- and TP-receptors on the non-pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.*, **107**:215-221.
41. Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Segi, E., Tsuboi, K., Aze, Y., Nishimura, T., Oida, H., Yoshida, N., Tanaka, T., Katsuyama, M., Hasumoto, K., Murata, T., Hirata, M., Ushikubi, F., Negishi, M., Ichikawa, A. et Narumiya, S. (1997) Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science*, **277**:681-683.

42. Crowston, J.G., Lindsey, J.D., Aihara, M. et Weinreb, R.N. (2004) Effect of latanoprost on intraocular pressure in mice lacking the prostaglandin FP receptor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**:3555-3559.
43. Thomas, D.W., Mannon, R.B., Mannon, P.J., Latour, A., Oliver, J.A., Hoffman, M., Smithies, O., Koller, B.H. et Coffman, T.M. (1998) Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A<sub>2</sub>. *J. Clin. Invest.*, **102**:1994-2001.
44. Rouzer, C.A. et Marnett, L.J. (2003) Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem. Rev.*, **103**:2239-2304.
45. Samuelsson, B., Morgenstern, R. et Jakobsson, P.J. (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol. Rev.*, **59**:207-224.
46. Claveau, D., Sirinyan, M., Guay, J., Gordon, R., Chan, C.C., Bureau, Y., Riendeau, D. et Mancini, J.A. (2003) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a major terminal synthase that is selectively up-regulated during cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> production in the rat adjuvant-induced arthritis model. *J. Immunol.*, **170**:4738-4744.
47. Guay, J., Bateman, K., Gordon, R., Mancini, J. et Riendeau, D. (2004) Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-1. *J. Biol. Chem.*, **279**:24866-24872.
48. Uematsu, S., Matsumoto, M., Takeda, K. et Akira, S. (2002) Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J. Immunol.*, **168**:5811-5816.
49. Scammell, T.E., Elmquist, J.K., Griffin, J.D. et Saper, C.B. (1996) Ventromedial preoptic prostaglandin E<sub>2</sub> activates fever-producing autonomic pathways. *J. Neurosci.*, **16**:6246-6254.
50. Daher, J.B. et Tonussi, C.R. (2003) A spinal mechanism for the peripheral anti-inflammatory action of indomethacin. *Brain Res.*, **962**:207-212.
51. Fahmi, H. (2004) mPGES-1 as a novel target for arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, **16**:623-627.
52. Cryer, B. (2001) Mucosal defense and repair. Role of prostaglandins in the stomach and duodenum. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **30**:877-8vi.
53. Miller, T.A. (1983) Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am. J. Physiol.*, **245**:G601-G623.

54. Johansson, C. et Bergstrom, S. (1982) Prostaglandin and protection of the gastroduodenal mucosa. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, **77**:21-46.
55. Chatzipanteli, K., Rudolph, S. et Axelrod, L. (1992) Coordinate control of lipolysis by prostaglandin E<sub>2</sub> and prostacyclin in rat adipose tissue. *Diabetes*, **41**:927-935.
56. Richelsen, B., Pedersen, S.B., Moller-Pedersen, T. et Bak, J.F. (1991) Regional differences in triglyceride breakdown in human adipose tissue: effects of catecholamines, insulin, and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Metabolism*, **40**:990-996.
57. Cipollone, F., Rocca, B. et Patrono, C. (2004) Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**:246-255.
58. Cipollone, F., Fazia, M.L., Iezzi, A., Cuccurullo, C., De Cesare, D., Uchino, S., Spigonardo, F., Marchetti, A., Buttitta, F., Paloscia, L., Mascellanti, M., Cuccurullo, F. et Mezzetti, A. (2005) Association between prostaglandin E receptor subtype EP<sub>4</sub> overexpression and unstable phenotype in atherosclerotic plaques in human. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**:1925-1931.
59. Sugimoto, Y. et Narumiya, S. (2007) Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.*, **282**:11613-11617.
60. Funk, C.D., Furci, L., FitzGerald, G.A., Grygorczyk, R., Rochette, C., Bayne, M.A., Abramovitz, M., Adam, M. et Metters, K.M. (1993) Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub> subtype. *J. Biol. Chem.*, **268**:26767-26772.
61. Abramovitz, M., Adam, M., Boie, Y., Grygorczyk, R., Rushmore, T.H., Nguyen, T., Funk, C.D., Bastien, L., Sawyer, N., Rochette, C., Slipetz, D.M. et Metters, K.M. (1995) Human prostanoid receptors: cloning and characterization. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*, **23**:499-504.
62. Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S. et Ichikawa, A. (1993) Cloning and expression of cDNA for a mouse EP<sub>1</sub> subtype of prostaglandin E receptor. *J. Biol. Chem.*, **268**:20175-20178.
63. Katoh, H., Watabe, A., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. et Negishi, M. (1995) Characterization of the signal transduction of prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub> subtype in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1244**:41-48.
64. Matsuoka, Y., Furuyashiki, T., Bito, H., Ushikubi, F., Tanaka, Y., Kobayashi, T., Muro, S., Satoh, N., Kayahara, T., Higashi, M., Mizoguchi, A., Shichi, H., Fukuda, Y., Nakao, K. et Narumiya, S. (2003) Impaired adrenocorticotrophic hormone response to bacterial endotoxin in mice deficient in prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub> and EP<sub>3</sub> subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**:4132-4137.

65. Matsuoka, Y., Furuyashiki, T., Yamada, K., Nagai, T., Bito, H., Tanaka, Y., Kitaoka, S., Ushikubi, F., Nabeshima, T. et Narumiya, S. (2005) Prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub> controls impulsive behavior under stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**:16066-16071.
66. Watanabe, K., Kawamori, T., Nakatsugi, S., Ohta, T., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Narumiya, S., Sugimura, T. et Wakabayashi, K. (2000) Inhibitory effect of a prostaglandin E receptor subtype EP(1) selective antagonist, ONO-8713, on development of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in mice. *Cancer Lett.*, **156**:57-61.
67. Niho, N., Mutoh, M., Kitamura, T., Takahashi, M., Sato, H., Yamamoto, H., Maruyama, T., Ohuchida, S., Sugimura, T. et Wakabayashi, K. (2005) Suppression of azoxymethane-induced colon cancer development in rats by a prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub>-selective antagonist. *Cancer Sci.*, **96**:260-264.
68. Nakayama, Y., Omote, K., Kawamata, T. et Namiki, A. (2004) Role of prostaglandin receptor subtype EP<sub>1</sub> in prostaglandin E<sub>2</sub>-induced nociceptive transmission in the rat spinal dorsal horn. *Brain Res.*, **1010**:62-68.
69. Kawahara, H., Sakamoto, A., Takeda, S., Onodera, H., Imaki, J. et Ogawa, R. (2001) A prostaglandin E<sub>2</sub> receptor subtype EP<sub>1</sub> receptor antagonist (ONO-8711) reduces hyperalgesia, allodynia, and c-fos gene expression in rats with chronic nerve constriction. *Anesth. Analg.*, **93**:1012-1017.
70. Okuda-Ashitaka, E., Sakamoto, K., Ezashi, T., Miwa, K., Ito, S. et Hayaishi, O. (1996) Suppression of prostaglandin E receptor signaling by the variant form of EP<sub>1</sub> subtype. *J. Biol. Chem.*, **271**:31255-31261.
71. Regan, J.W., Bailey, T.J., Pepperl, D.J., Pierce, K.L., Bogardus, A.M., Donello, J.E., Fairbairn, C.E., Kedzie, K.M., Woodward, D.F. et Gil, D.W. (1994) Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP<sub>2</sub> subtype. *Mol. Pharmacol.*, **46**:213-220.
72. Katsuyama, M., Nishigaki, N., Sugimoto, Y., Morimoto, K., Negishi, M., Narumiya, S. et Ichikawa, A. (1995) The mouse prostaglandin E receptor EP<sub>2</sub> subtype: cloning, expression, and northern blot analysis. *FEBS Lett.*, **372**:151-156.
73. Nishigaki, N., Negishi, M. et Ichikawa, A. (1996) Two G<sub>s</sub>-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub>, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol. Pharmacol.*, **50**:1031-1037.
74. Hatae, N., Sugimoto, Y. et Ichikawa, A. (2002) Prostaglandin receptors: advances in the study of EP<sub>3</sub> receptor signaling. *J. Biochem. (Tokyo)*, **131**:781-784.
75. Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A. et Narumiya, S. (1992) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype. *J. Biol. Chem.*, **267**:6463-6466.

76. Kotani, M., Tanaka, I., Ogawa, Y., Usui, T., Mori, K., Ichikawa, A., Narumiya, S., Yoshimi, T. et Nakao, K. (1995) Molecular cloning and expression of multiple isoforms of human prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype generated by alternative messenger RNA splicing: multiple second messenger systems and tissue-specific distributions. *Mol. Pharmacol.*, **48**:869-879.
77. Pierce, K.L. et Regan, J.W. (1998) Prostanoid receptor heterogeneity through alternative mRNA splicing. *Life Sci.*, **62**:1479-1483.
78. Bilson, H.A., Mitchell, D.L. et Ashby, B. (2004) Human prostaglandin EP<sub>3</sub> receptor isoforms show different agonist-induced internalization patterns. *FEBS Lett.*, **572**:271-275.
79. Irie, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Harazono, A., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Narumiya, S. et Ichikawa, A. (1993) Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP<sub>3</sub> subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur. J. Biochem.*, **217**:313-318.
80. Jin, J., Mao, G.F. et Ashby, B. (1997) Constitutive activity of human prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> isoforms. *Br. J. Pharmacol.*, **121**:317-323.
81. Bastien, L., Sawyer, N., Grygorczyk, R., Metters, K.M. et Adam, M. (1994) Cloning, functional expression, and characterization of the human prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>2</sub> subtype. *J. Biol. Chem.*, **269**:11873-11877.
82. Bastepe, M. et Ashby, B. (1997) The long cytoplasmic carboxyl terminus of the prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>4</sub> subtype is essential for agonist-induced desensitization. *Mol. Pharmacol.*, **51**:343-349.
83. Bastepe, M. et Ashby, B. (1999) Identification of a region of the C-terminal domain involved in short-term desensitization of the prostaglandin EP<sub>4</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **126**:365-371.
84. Kabashima, K., Saji, T., Murata, T., Nagamachi, M., Matsuoka, T., Segi, E., Tsuboi, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Miyachi, Y., Ichikawa, A. et Narumiya, S. (2002) The prostaglandin receptor EP<sub>4</sub> suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J. Clin. Invest.*, **109**:883-893.
85. Lewis, R.A., Soter, N.A., Diamond, P.T., Austen, K.F., Oates, J.A. et Roberts, L.J. (1982) Prostaglandin D<sub>2</sub> generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *J. Immunol.*, **129**:1627-1631.
86. Kabashima, K. et Narumiya, S. (2003) The DP receptor, allergic inflammation and asthma. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **69**:187-194.
87. Urade, Y., Hayaishi, O., Matsumura, H. et Watanabe, K. (1996) Molecular mechanism of sleep regulation by prostaglandin D<sub>2</sub>. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.*, **14**:71-82.



88. Heavey, D.J., Lumley, P., Barrow, S.E., Murphy, M.B., Humphrey, P.P. et Dollery, C.T. (1984) Effects of intravenous infusions of prostaglandin D<sub>2</sub> in man. *Prostaglandins*, **28**:755-767.
89. Boie, Y., Sawyer, N., Slipetz, D.M., Metters, K.M. et Abramovitz, M. (1995) Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J. Biol. Chem.*, **270**:18910-18916.
90. Oida, H., Hirata, M., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Ohishi, H., Mizuno, N., Ichikawa, A. et Narumiya, S. (1997) Expression of messenger RNA for the prostaglandin D receptor in the leptomeninges of the mouse brain. *FEBS Lett.*, **417**:53-56.
91. Wright, D.H., Nantel, F., Metters, K.M. et Ford-Hutchinson, A.W. (1999) A novel biological role for prostaglandin D<sub>2</sub> is suggested by distribution studies of the rat DP prostanoid receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **377**:101-115.
92. Kliewer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C. et Lehmann, J.M. (1995) A prostaglandin J<sub>2</sub> metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, **83**:813-819.
93. Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M. et Evans, R.M. (1995) 15-Deoxy-delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, **83**:803-812.
94. Simonin, M.A., Bordji, K., Boyault, S., Bianchi, A., Gouze, E., Becuwe, P., Dauca, M., Netter, P. et Terlain, B. (2002) PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **282**:C125-C133.
95. Castrillo, A., Diaz-Guerra, M.J., Hortelano, S., Martin-Sanz, P. et Bosca, L. (2000) Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol. Cell. Biol.*, **20**:1692-1698.
96. Harris, S.G. et Phipps, R.P. (2001) The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur. J. Biochem.*, **31**:1098-1105.
97. Rajakariar, R., Hilliard, M., Lawrence, T., Trivedi, S., Colville-Nash, P., Bellingan, G., Fitzgerald, D., Yaqoob, M.M. et Gilroy, D.W. (2007) Hematopoietic prostaglandin D<sub>2</sub> synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD<sub>2</sub> and 15-deoxyDelta<sup>12,14</sup> PGJ<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**:20979-20984.
98. Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. et Phipps, R.P. (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.*, **23**:144-150.

99. Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. et Vane, J.R. (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**:663-665.
100. Whittaker, N., Bunting, S., Salmon, J., Moncada, S., Vane, J.R., Johnson, R.A., Morton, D.R., Kinner, J.H., Gorman, R.R., McGuire, J.C. et Sun, F.F. (1976) The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins*, **12**:915-928.
101. Weksler, B.B., Marcus, A.J. et Jaffe, E.A. (1977) Synthesis of prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**:3922-3926.
102. Bolger, P.M., Eisner, G.M., Ramwell, P.W. et Slotkoff, L.M. (1978) Renal actions of prostacyclin. *Nature*, **271**:467-469.
103. Nasrallah, R., Clark, J. et Hebert, R.L. (2007) Prostaglandins in the kidney: developments since Y2K. *Clin. Sci. (Lond)*, **113**:297-311.
104. Boie, Y., Rushmore, T.H., Darmon-Goodwin, A., Grygorczyk, R., Slipetz, D.M., Metters, K.M. et Abramovitz, M. (1994) Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**:12173-12178.
105. Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Namba, T., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S. et Ichikawa, A. (1994) Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett.*, **344**:74-78.
106. Nakagawa, O., Tanaka, I., Usui, T., Harada, M., Sasaki, Y., Itoh, H., Yoshimasa, T., Namba, T., Narumiya, S. et Nakao, K. (1994) Molecular cloning of human prostacyclin receptor cDNA and its gene expression in the cardiovascular system. *Circulation*, **90**:1643-1647.
107. Liu, K.L., Hadj, A.A., Lareal, M.C., Benzoni, D., Sassard, J. et Zech, P. (1990) Basal prostaglandin synthesis by the isolated perfused rat kidney. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **39**:261-265.
108. Abramovitz, M., Boie, Y., Nguyen, T., Rushmore, T.H., Bayne, M.A., Metters, K.M., Slipetz, D.M. et Grygorczyk, R. (1994) Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**:2632-2636.
109. Saito, O., Guan, Y., Qi, Z., Davis, L.S., Komhoff, M., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Breyer, R.M. et Breyer, M.D. (2003) Expression of the prostaglandin F receptor (FP) gene along the mouse genitourinary tract. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **284**:F1164-F1170.
110. Schlotzer-Schrehardt, U., Zenkel, M. et Nusing, R.M. (2002) Expression and localization of FP and EP prostanoid receptor subtypes in human ocular tissues. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**:1475-1487.

111. Lake, S., Gullberg, H., Wahlqvist, J., Sjogren, A.M., Kinhult, A., Lind, P., Hellstrom-Lindahl, E. et Stjernschantz, J. (1994) Cloning of the rat and human prostaglandin F<sub>2</sub> alpha receptors and the expression of the rat prostaglandin F<sub>2</sub> alpha receptor. *FEBS Lett.*, **355**:317-325.
112. Pierce, K.L., Bailey, T.J., Hoyer, P.B., Gil, D.W., Woodward, D.F. et Regan, J.W. (1997) Cloning of a carboxyl-terminal isoform of the prostanoid FP receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**:883-887.
113. Srinivasan, D., Fujino, H. et Regan, J.W. (2002) Differential internalization of the prostaglandin F(2alpha) receptor isoforms: role of protein kinase C and clathrin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **302**:219-224.
114. Vielhauer, G.A., Fujino, H. et Regan, J.W. (2004) Cloning and localization of hFP(S): a six-transmembrane mRNA splice variant of the human FP prostanoid receptor. *Arch. Biochem. Biophys.*, **421**:175-185.
115. Alm, A. (1998) Prostaglandin derivatives as ocular hypotensive agents. *Prog. Retin. Eye Res.*, **17**:291-312.
116. Anderson, M.W., Crutchley, D.J., Tainer, B.E. et Eling, T.E. (1978) Kinetic studies on the conversion of prostaglandin endoperoxide PGH<sub>2</sub> by thromboxane synthase. *Prostaglandins*, **16**:563-570.
117. Raychowdhury, M.K., Yukawa, M., Collins, L.J., McGrail, S.H., Kent, K.C. et Ware, J.A. (1994) Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**:19256-19261. Correction (1995) *J. Biol. Chem.* **270**:7011.
118. Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S. et Narumiya, S. (1991) Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature*, **349**:617-620.
119. Namba, T., Sugimoto, Y., Hirata, M., Hayashi, Y., Honda, A., Watabe, A., Negishi, M., Ichikawa, A. et Narumiya, S. (1992) Mouse thromboxane A<sub>2</sub> receptor: cDNA cloning, expression and northern blot analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**:1197-1203.
120. Shenker, A., Goldsmith, P., Unson, C.G. et Spiegel, A.M. (1991) The G protein coupled to the thromboxane A<sub>2</sub> receptor in human platelets is a member of the novel G<sub>q</sub> family. *J. Biol. Chem.*, **266**:9309-9313.
121. Parent, J.L., Labrecque, P., Orsini, M.J. et Benovic, J.L. (1999) Internalization of the TXA<sub>2</sub> receptor alpha and beta isoforms. Role of the differentially spliced COOH terminus in agonist-promoted receptor internalization. *J. Biol. Chem.*, **274**:8941-8948.

122. Peters-Golden, M. et Henderson, W.R., Jr. (2007) Leukotrienes. *N. Engl. J. Med.*, **357**:1841-1854.
123. Carter, G.W., Young, P.R., Albert, D.H., Bouska, J., Dyer, R., Bell, R.L., Summers, J.B. et Brooks, D.W. (1991) 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**:929-937.
124. Drazen, J.M., Israel, E. et O'Byrne, P.M. (1999) Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N. Engl. J. Med.*, **340**:197-206.
125. Peters-Golden, M. et Brock, T.G. (2001) Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Lett.*, **487**:323-326.
126. Miller, D.K., Gillard, J.W., Vickers, P.J., Sadowski, S., Leveille, C., Mancini, J.A., Charleson, P., Dixon, R.A., Ford-Hutchinson, A.W., Fortin, R., Gauthier, J.Y., Rodkey, J., Rosen, R., Rouzer, C., Sigal, I.S., Strader, C.D. et Evans, J.F. (1990) Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature*, **343**:278-281.
127. Dixon, R.A., Diehl, R.E., Opas, E., Rands, E., Vickers, P.J., Evans, J.F., Gillard, J.W. et Miller, D.K. (1990) Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature*, **343**:282-284.
128. Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A. et Persson, B. (2000) Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **161**:S20-S24.
129. Bresell, A., Weinander, R., Lundqvist, G., Raza, H., Shimoji, M., Sun, T.H., Balk, L., Wiklund, R., Eriksson, J., Jansson, C., Persson, B., Jakobsson, P.J. et Morgenstern, R. (2005) Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.*, **272**:1688-1703.
130. Mancini, J.A., Abramovitz, M., Cox, M.E., Wong, E., Charleson, S., Perrier, H., Wang, Z., Prasit, P. et Vickers, P.J. (1993) 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett.*, **318**:277-281.
131. Abramovitz, M., Wong, E., Cox, M.E., Richardson, C.D., Li, C. et Vickers, P.J. (1993) 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.*, **215**:105-111.
132. Rouzer, C.A., Ford-Hutchinson, A.W., Morton, H.E. et Gillard, J.W. (1990) MK886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. *J. Biol. Chem.*, **265**:1436-1442.
133. Gillard, J., Ford-Hutchinson, A.W., Chan, C., Charleson, S., Denis, D., Foster, A., Fortin, R., Leger, S., McFarlane, C.S., Morton, H., Piechuta, H., Riendeau, D.,

- Rouzer, C.A., Rokach, J., Young, R., MacIntyre, D.E., Peterson, L., Bach, T., Eiermann, G., Hopple, S., Humes, J., Hupe, L., Luell, S., Metzger, J., Meurer, R., Miller, D.K., Opas, E. et Pacholok, S. (1989) L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2 - dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **67**:456-464.
134. Samuelsson, B. (1983) Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, **220**:568-575.
135. Serhan, C.N. (2005) Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **73**:141-162.
136. Mancini, J.A. et Evans, J.F. (1995) Cloning and characterization of the human leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase gene. *Eur. J. Biochem.*, **231**:65-71.
137. Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A. et Serhan, C.N. (1987) Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, **237**:1171-1176.
138. Tager, A.M. et Luster, A.D. (2003) BLT<sub>1</sub> and BLT<sub>2</sub>: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **69**:123-134.
139. Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y. et Shimizu, T. (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis. *Nature*, **387**:620-624.
140. Masuda, K., Yokomizo, T., Izumi, T. et Shimizu, T. (1999) cDNA cloning and characterization of guinea-pig leukotriene B<sub>4</sub> receptor. *Biochem. J.*, **342**:79-85.
141. Yokomizo, T., Kato, K., Terawaki, K., Izumi, T. et Shimizu, T. (2000) A second leukotriene B(4) receptor, BLT<sub>2</sub>. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.*, **192**:421-432.
142. Welsch, D.J., Creely, D.P., Hauser, S.D., Mathis, K.J., Krivi, G.G. et Isakson, P.C. (1994) Molecular cloning and expression of human leukotriene-C<sub>4</sub> synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**:9745-9749.
143. Murphy, R.C. et Gijon, M.A. (2007) Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem. J.*, **405**:379-395.
144. Lynch, K.R., O'Neill, G.P., Liu, Q., Im, D.S., Sawyer, N., Metters, K.M., Coulombe, N., Abramovitz, M., Figueroa, D.J., Zeng, Z., Connolly, B.M., Bai, C., Austin, C.P., Chateauneuf, A., Stocco, R., Greig, G.M., Kargman, S., Hooks, S.B., Hosfield, E., Williams, D.L., Jr., Ford-Hutchinson, A.W., Caskey, C.T. et Evans, J.F. (1999) Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT<sub>1</sub> receptor. *Nature*, **399**:789-793.

145. Sarau, H.M., Ames, R.S., Chambers, J., Ellis, C., Elshourbagy, N., Foley, J.J., Schmidt, D.B., Muccitelli, R.M., Jenkins, O., Murdock, P.R., Herrity, N.C., Halsey, W., Sathe, G., Muir, A.I., Nuthulaganti, P., Dytko, G.M., Buckley, P.T., Wilson, S., Bergsma, D.J. et Hay, D.W. (1999) Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol. Pharmacol.*, **56**:657-663.
146. Heise, C.E., O'Dowd, B.F., Figueroa, D.J., Sawyer, N., Nguyen, T., Im, D.S., Stocco, R., Bellefeuille, J.N., Abramovitz, M., Cheng, R., Williams, D.L., Jr., Zeng, Z., Liu, Q., Ma, L., Clements, M.K., Coulombe, N., Liu, Y., Austin, C.P., George, S.R., O'Neill, G.P., Metters, K.M., Lynch, K.R. et Evans, J.F. (2000) Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J. Biol. Chem.*, **275**:30531-30536.
147. Jones, T.R., Labelle, M., Belley, M., Champion, E., Charette, L., Evans, J., Ford-Hutchinson, A.W., Gauthier, J.Y., Lord, A., Masson, P., McAuliffe, M., McFarlane, C.S., Metters, K.M., Pickett, C., Piechuta, H., Rochette, C., Rodger, I.W., Sawyer, N., Young, R.N., Zamboni, R. et Abraham, W.M. (1995) Pharmacology of montelukast sodium (Singulair), a potent and selective leukotriene D<sub>4</sub> receptor antagonist. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**:191-201.
148. Krell, R.D., Dehaas, C.J., Lengel, D.J., Kusner, E.J., Williams, J.C. et Buckner, C.K. (1994) Preclinical exploration of the potential antiinflammatory properties of the peptide leukotriene antagonist ICI 204,219 (Accolate). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **744**:289-298.
149. Storms, W. (2007) Update on montelukast and its role in the treatment of asthma, allergic rhinitis and exercise-induced bronchoconstriction. *Expert Opin. Pharmacother.*, **8**:2173-2187.
150. Serhan, C.N. (1994) Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. *Biochim. Biophys. Acta*, **1212**:1-25.
151. Serhan, C.N. et Sheppard, K.A. (1990) Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A<sub>4</sub> by platelet 12-lipoxygenase *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **85**:772-780.
152. Takano, T., Fiore, S., Maddox, J.F., Brady, H.R., Petasis, N.A. et Serhan, C.N. (1997) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) and LXA<sub>4</sub> stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *J. Exp. Med.*, **185**:1693-1704.
153. Gewirtz, A.T., McCormick, B., Neish, A.S., Petasis, N.A., Gronert, K., Serhan, C.N. et Madara, J.L. (1998) Pathogen-induced chemokine secretion from model intestinal epithelium is inhibited by lipoxin A<sub>4</sub> analogs. *J. Clin. Invest.*, **101**:1860-1869.

154. Karp, C.L., Flick, L.M., Park, K.W., Softic, S., Greer, T.M., Keledjian, R., Yang, R., Uddin, J., Guggino, W.B., Atabani, S.F., Belkaid, Y., Xu, Y., Whitsett, J.A., Accurso, F.J., Wills-Karp, M. et Petasis, N.A. (2004) Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat. Immunol.*, **5**:388-392.
155. Capdevila, J.H., Falck, J.R. et Harris, R.C. (2000) Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J. Lipid. Res.*, **41**:163-181.
156. Spector, A.A., Fang, X., Snyder, G.D. et Weintraub, N.L. (2004) Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog. Lipid Res.*, **43**:55-90.
157. Oliw, E.H. et Oates, J.A. (1981) Oxygenation of arachidonic acid by hepatic microsomes of the rabbit. Mechanism of biosynthesis of two vicinal dihydroxyeicosatrienoic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **666**:327-340.
158. Capdevila, J.H. et Falck, J.R. (2001) The CYP P450 arachidonic acid monooxygenases: from cell signaling to blood pressure regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**:571-576.
159. Hu, S. et Kim, H.S. (1993) Activation of K<sup>+</sup> channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur. J. Pharmacol.*, **230**:215-221.
160. Campbell, W.B., Gebremedhin, D., Pratt, P.F. et Harder, D.R. (1996) Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.*, **78**:415-423.
161. Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D.R., Fleming, I. et Busse, R. (1999) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, **401**:493-497.
162. Ma, Y.H., Gebremedhin, D., Schwartzman, M.L., Falck, J.R., Clark, J.E., Masters, B.S., Harder, D.R. et Roman, R.J. (1993) 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries. *Circ. Res.*, **72**:126-136.
163. Lange, A., Gebremedhin, D., Narayanan, J. et Harder, D. (1997) 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoconstriction and inhibition of potassium current in cerebral vascular smooth muscle is dependent on activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **272**:27345-27352.
164. Milne, G.L. et Morrow, J.D. (2006) Isoprostanes and related compounds: update 2006. *Antioxid. Redox Signal.*, **8**:1379-1384.
165. Pratico, D., Lawson, J.A., Rokach, J. et FitzGerald, G.A. (2001) The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol. Metab.*, **12**:243-247.

166. Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F. et Roberts, L.J. (1990) A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced *in vivo* in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**:9383-9387.
167. Morrow, J.D., Awad, J.A., Boss, H.J., Blair, I.A. et Roberts, L.J. (1992) Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F<sub>2</sub>-isoprostanes) are formed *in situ* on phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**:10721-10725.
168. Kadiiska, M.B., Gladen, B.C., Baird, D.D., Germolec, D., Graham, L.B., Parker, C.E., Nyska, A., Wachsmann, J.T., Ames, B.N., Basu, S., Brot, N., FitzGerald, G.A., Floyd, R.A., George, M., Heinecke, J.W., Hatch, G.E., Hensley, K., Lawson, J.A., Marnett, L.J., Morrow, J.D., Murray, D.M., Plastaras, J., Roberts, L.J., Rokach, J., Shigenaga, M.K., Sohal, R.S., Sun, J., Tice, R.R., Van Thiel, D.H., Wellner, D., Walter, P.B., Tomer, K.B., Mason, R.P. et Barrett, J.C. (2005) Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl<sub>4</sub> poisoning? *Free Radic. Biol. Med.*, **38**:698-710.
169. Cracowski, J.L., Durand, T. et Bessard, G. (2002) Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**:360-366.
170. Schaloske, R.H. et Dennis, E.A. (2006) The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**:1246-1259.
171. Leslie, C.C. (2004) Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **70**:373-376.
172. Clark, J.D., Lin, L.L., Kriz, R.W., Ramesha, C.S., Sultzman, L.A., Lin, A.Y., Milona, N. et Knopf, J.L. (1991) A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA<sub>2</sub> contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, **65**:1043-1051.
173. Diez, E., Louis-Flamberg, P., Hall, R.H. et Mayer, R.J. (1992) Substrate specificities and properties of human phospholipases A<sub>2</sub> in a mixed vesicle model. *J. Biol. Chem.*, **267**:18342-18348.
174. Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y., Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J. et Shimizu, T. (1997) Role of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in allergic response and parturition. *Nature*, **390**:618-622.
175. Bonventre, J.V., Huang, Z., Taheri, M.R., O'Leary, E., Li, E., Moskowitz, M.A. et Sapirstein, A. (1997) Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Nature*, **390**:622-625.



176. Nalefski, E.A., Sultzman, L.A., Martin, D.M., Kriz, R.W., Towler, P.S., Knopf, J.L. et Clark, J.D. (1994) Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain. *J. Biol. Chem.*, **269**:18239-18249.
177. Evans, J.H., Spencer, D.M., Zweifach, A. et Leslie, C.C. (2001) Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> translocation to internal membranes. *J. Biol. Chem.*, **276**:30150-30160.
178. Lin, L.L., Wartmann, M., Lin, A.Y., Knopf, J.L., Seth, A. et Davis, R.J. (1993) cPLA<sub>2</sub> is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*, **72**:269-278.
179. Hefner, Y., Borsch-Haubold, A.G., Murakami, M., Wilde, J.I., Pasquet, S., Schieltz, D., Ghomashchi, F., Yates, J.R., III, Armstrong, C.G., Paterson, A., Cohen, P., Fukunaga, R., Hunter, T., Kudo, I., Watson, S.P. et Gelb, M.H. (2000) Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> by MNK1-related protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **275**:37542-37551.
180. Muthalif, M.M., Hefner, Y., Canaan, S., Harper, J., Zhou, H., Parmentier, J.H., Aebbersold, R., Gelb, M.H. et Malik, K.U. (2001) Functional interaction of calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A(2). *J. Biol. Chem.*, **276**:39653-39660.
181. Smith, W.L., DeWitt, D.L. et Garavito, R.M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**:145-182.
182. Roos, K.L. et Simmons, D.L. (2005) Cyclooxygenase variants: the role of alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**:62-69.
183. Dinchuk, J.E., Liu, R.Q. et Trzaskos, J.M. (2003) COX-3: in the wrong frame in mind. *Immunol. Lett.*, **86**:121.
184. Blobaum, A.L. et Marnett, L.J. (2007) Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J. Med. Chem.*, **50**:1425-1441.
185. Campbell, C.L., Smyth, S., Montalescot, G. et Steinhubl, S.R. (2007) Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *JAMA*, **297**:2018-2024.
186. Hinz, B. et Brune, K. (2002) Cyclooxygenase-2--10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**:367-375.
187. Hemler, M., Lands, W.E. et Smith, W.L. (1976) Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J. Biol. Chem.*, **251**:5575-5579.

188. Kosaka, T., Miyata, A., Ihara, H., Hara, S., Sugimoto, T., Takeda, O., Takahashi, E. et Tanabe, T. (1994) Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur. J. Biochem.*, **221**:889-897.
189. Yokoyama, C. et Tanabe, T. (1989) Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**:888-894.
190. Morita, I., Schindler, M., Regier, M.K., Otto, J.C., Hori, T., DeWitt, D.L. et Smith, W.L. (1995) Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **270**:10902-10908.
191. Vane, J.R., Bakhle, Y.S. et Botting, R.M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**:97-120.
192. Picot, D., Loll, P.J. et Garavito, R.M. (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H<sub>2</sub> synthase-1. *Nature*, **367**:243-249.
193. Mizuno, K., Yamamoto, S. et Lands, W.E. (1982) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on fatty acid cyclooxygenase and prostaglandin hydroperoxidase activities. *Prostaglandins*, **23**:743-757.
194. Lu, G., Tsai, A.L., Van Wart, H.E. et Kulmacz, R.J. (1999) Comparison of the peroxidase reaction kinetics of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **274**:16162-16167.
195. Marnett, L.J. et Kalgutkar, A.S. (1999) Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**:465-469.
196. Xie, W.L., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L. et Simmons, D.L. (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**:2692-2696.
197. Kujubu, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C., Lim, R.W. et Herschman, H.R. (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.*, **266**:12866-12872.
198. Hla, T. et Neilson, K. (1992) Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**:7384-7388.
199. Kulmacz, R.J. et Wang, L.H. (1995) Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **270**:24019-24023.
200. Swinney, D.C., Mak, A.Y., Barnett, J. et Ramesha, C.S. (1997) Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid. *J. Biol. Chem.*, **272**:12393-12398.

201. Shitashige, M., Morita, I. et Murota, S. (1998) Different substrate utilization between prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 in NIH3T3 fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **1389**:57-66.
202. Chen, W., Pawelek, T.R. et Kulmacz, R.J. (1999) Hydroperoxide dependence and cooperative cyclooxygenase kinetics in prostaglandin H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **274**:20301-20306.
203. Reuter, B.K., Asfaha, S., Buret, A., Sharkey, K.A. et Wallace, J.L. (1996) Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.*, **98**:2076-2085.
204. Mizuno, H., Sakamoto, C., Matsuda, K., Wada, K., Uchida, T., Noguchi, H., Akamatsu, T. et Kasuga, M. (1997) Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology*, **112**:387-397.
205. Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C. et Stallings, W.C. (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, **384**:644-648.
206. Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C. et Browner, M.F. (1996) Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat. Struct. Biol.*, **3**:927-933.
207. Mitchell, J.A., Belvisi, M.G., Akarasereenont, P., Robbins, R.A., Kwon, O.J., Croxtall, J., Barnes, P.J. et Vane, J.R. (1994) Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.*, **113**:1008-1014.
208. Wu, K.K. (2006) Transcription-based COX-2 inhibition: a therapeutic strategy. *Thromb. Haemost.*, **96**:417-422.
209. Schroer, K., Zhu, Y., Saunders, M.A., Deng, W.G., Xu, X.M., Meyer-Kirchrath, J. et Wu, K.K. (2002) Obligatory role of cyclic adenosine monophosphate response element in cyclooxygenase-2 promoter induction and feedback regulation by inflammatory mediators. *Circulation*, **105**:2760-2765.
210. Barry, O.P., Kazanietz, M.G., Pratico, D. et FitzGerald, G.A. (1999) Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **274**:7545-7556.
211. Hwang, D., Jang, B.C., Yu, G. et Boudreau, M. (1997) Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, **54**:87-96.

212. Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N. et Yamamoto, S. (1995) Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.*, **270**:31315-31320.
213. Potter, S., Mitchell, M.D., Hansen, W.R. et Marvin, K.W. (2000) NF-IL6 and CRE elements principally account for both basal and interleukin-1 beta-induced transcriptional activity of the proximal 528bp of the PGHS-2 promoter in amnion-derived AV3 cells: evidence for involvement of C/EBP beta. *Mol. Hum. Reprod.*, **6**:771-778.
214. Deng, W.G., Zhu, Y. et Wu, K.K. (2003) Up-regulation of p300 binding and p50 acetylation in tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 promoter activation. *J. Biol. Chem.*, **278**:4770-4777.
215. Ichitani, Y., Shi, T., Haeggstrom, J.Z., Samuelsson, B. et Hokfelt, T. (1997) Increased levels of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord after peripheral inflammation: an in situ hybridization study. *Neuroreport*, **8**:2949-2952.
216. Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K. et Watanabe, Y. (1995) Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. *Brain Res.*, **697**:187-196.
217. Quan, N., Whiteside, M. et Herkenham, M. (1998) Cyclooxygenase 2 mRNA expression in rat brain after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res.*, **802**:189-197.
218. Mancini, J.A., Blood, K., Guay, J., Gordon, R., Claveau, D., Chan, C.C. et Riendeau, D. (2001) Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J. Biol. Chem.*, **276**:4469-4475.
219. Amin, A.R., Attur, M., Patel, R.N., Thakker, G.D., Marshall, P.J., Rediske, J., Stuchin, S.A., Patel, I.R. et Abramson, S.B. (1997) Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J. Clin. Invest.*, **99**:1231-1237.
220. Kang, R.Y., Freire-Moar, J., Sigal, E. et Chu, C.Q. (1996) Expression of cyclooxygenase-2 in human and an animal model of rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.*, **35**:711-718.
221. Kargman, S.L., O'Neill, G.P., Vickers, P.J., Evans, J.F., Mancini, J.A. et Jothy, S. (1995) Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res.*, **55**:2556-2559.
222. Kutchera, W., Jones, D.A., Matsunami, N., Groden, J., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., White, R.L. et Prescott, S.M. (1996) Prostaglandin H synthase

- 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**:4816-4820.
223. Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S. et DuBois, R.N. (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, **107**:1183-1188.
224. Zimmermann, K.C., Sarbia, M., Weber, A.A., Borchard, F., Gabbert, H.E. et Schror, K. (1999) Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res.*, **59**:198-204.
225. Tucker, O.N., Dannenberg, A.J., Yang, E.K., Zhang, F., Teng, L., Daly, J.M., Soslow, R.A., Masferrer, J.L., Woerner, B.M., Koki, A.T. et Fahey, T.J., III (1999) Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res.*, **59**:987-990.
226. Gupta, R.A. et DuBois, R.N. (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer.*, **1**:11-21.
227. Pasinetti, G.M. et Aisen, P.S. (1998) Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience*, **87**:319-324.
228. McGeer, P.L. et McGeer, E.G. (2007) NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol. Aging*, **28**:639-647.
229. Reines, S.A., Block, G.A., Morris, J.C., Liu, G., Nessly, M.L., Lines, C.R., Norman, B.A. et Baranak, C.C. (2004) Rofecoxib: no effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study. *Neurology*, **62**:66-71.
230. Soininen, H., West, C., Robbins, J. et Niculescu, L. (2007) Long-term efficacy and safety of celecoxib in Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **23**:8-21.
231. Breder, C.D., Dewitt, D. et Kraig, R.P. (1995) Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **355**:296-315.
232. Harris, R.C., McKanna, J.A., Akai, Y., Jacobson, H.R., DuBois, R.N. et Breyer, M.D. (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest.*, **94**:2504-2510.
233. Ermert, L., Ermert, M., Goppelt-Struebe, M., Walmrath, D., Grimminger, F., Steudel, W., Ghofrani, H.A., Homberger, C., Duncker, H. et Seeger, W. (1998) Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **18**:479-488.

234. Yang, T., Singh, I., Pham, H., Sun, D., Smart, A., Schnermann, J.B. et Briggs, J.P. (1998) Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am. J. Physiol.*, **274**:F481-F489.
235. Schwartz, J.I., Vandormael, K., Malice, M.P., Kalyani, R.N., Lasseter, K.C., Holmes, G.B., Gertz, B.J., Gottesdiener, K.M., Laurenzi, M., Redfern, K.J. et Brune, K. (2002) Comparison of rofecoxib, celecoxib, and naproxen on renal function in elderly subjects receiving a normal-salt diet. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **72**:50-61.
236. Catella-Lawson, F., McAdam, B., Morrison, B.W., Kapoor, S., Kujubu, D., Antes, L., Lasseter, K.C., Quan, H., Gertz, B.J. et FitzGerald, G.A. (1999) Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**:735-741.
237. Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S. et Simmons, D.L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**:13926-13931.
238. Shaftel, S.S., Olschowka, J.A., Hurley, S.D., Moore, A.H. et O'Banion, M.K. (2003) COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Brain. Res. Mol. Brain Res.*, **119**:213-215.
239. Snipes, J.A., Kis, B., Shelness, G.S., Hewett, J.A. et Busija, D.W. (2005) Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **313**:668-676.
240. Langenbach, R., Morham, S.G., Tiano, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D., Kim, H.S. et Smithies, O. (1995) Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell*, **83**:483-492.
241. Morham, S.G., Langenbach, R., Loftin, C.D., Tiano, H.F., Vouloumanos, N., Jennette, J.C., Mahler, J.F., Kluckman, K.D., Ledford, A., Lee, C.A. et Smithies, O. (1995) Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*, **83**:473-482.
242. Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, R.J., Johnston, J.J., Jaffee, B.D., Covington, M.B., Contel, N.R., Eng, V.M., Collins, R.J., Czerniak, P.M. et . (1995) Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*, **378**:406-409.
243. Li, S., Wang, Y., Matsumura, K., Ballou, L.R., Morham, S.G. et Blatteis, C.M. (1999) The febrile response to lipopolysaccharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase-1(-/-) mice. *Brain Res.*, **825**:86-94.

244. Myers, L.K., Kang, A.H., Postlethwaite, A.E., Rosloniec, E.F., Morham, S.G., Shlopov, B.V., Goorha, S. et Ballou, L.R. (2000) The genetic ablation of cyclooxygenase 2 prevents the development of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.*, **43**:2687-2693.
245. Zhang, J., Goorha, S., Raghow, R. et Ballou, L.R. (2002) The tissue-specific, compensatory expression of cyclooxygenase-1 and -2 in transgenic mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **67**:121-135.
246. Kirtikara, K., Morham, S.G., Raghow, R., Laulederkind, S.J., Kanekura, T., Goorha, S. et Ballou, L.R. (1998) Compensatory prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis in cyclooxygenase 1 or 2 null cells. *J. Exp. Med.*, **187**:517-523.
247. Ouellet, M., Falgoutyret, J.P., Ear, P.H., Pen, A., Mancini, J.A., Riendeau, D. et Percival, M.D. (2002) Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin E synthase-1. *Protein Expr. Purif.*, **26**:489-495.
248. Thoren, S., Weinander, R., Saha, S., Jegerschold, C., Pettersson, P.L., Samuelsson, B., Hebert, H., Hamberg, M., Morgenstern, R. et Jakobsson, P.J. (2003) Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination. *J. Biol. Chem.*, **278**:22199-22209.
249. Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S. et Watanabe, K. (2002) Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**:884-889.
250. Jakobsson, P.J., Thoren, S., Morgenstern, R. et Samuelsson, B. (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**:7220-7225.
251. Forsberg, L., Leeb, L., Thoren, S., Morgenstern, R. et Jakobsson, P. (2000) Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett.*, **471**:78-82.
252. Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S. et Kudo, I. (2000) Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **275**:32783-32792.
253. Holm, P.J., Morgenstern, R. et Hebert, H. (2002) The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22(1)2(1) crystals. *Biochim. Biophys. Acta*, **1594**:276-285.
254. Ferguson, A.D., McKeever, B.M., Xu, S., Wisniewski, D., Miller, D.K., Yamin, T.T., Spencer, R.H., Chu, L., Ujjainwalla, F., Cunningham, B.R., Evans, J.F. et

- Becker, J.W. (2007) Crystal structure of inhibitor-bound human 5-lipoxygenase-activating protein. *Science*, **317**:510-512.
255. Ago, H., Kanaoka, Y., Irikura, D., Lam, B.K., Shimamura, T., Austen, K.F. et Miyano, M. (2007) Crystal structure of a human membrane protein involved in cysteinyl leukotriene biosynthesis. *Nature*, **448**:609-612.
256. Molina, D.M., Wetterholm, A., Kohl, A., McCarthy, A.A., Niegowski, D., Ohlson, E., Hammarberg, T., Eshaghi, S., Haeggstrom, J.Z. et Nordlund, P. (2007) Structural basis for synthesis of inflammatory mediators by human leukotriene C<sub>4</sub> synthase. *Nature*, **448**:613-616.
257. Boulet, L., Ouellet, M., Bateman, K.P., Ethier, D., Percival, M.D., Riendeau, D., Mancini, J.A. et Methot, N. (2004) Deletion of microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthase-1 reduces inducible and basal PGE<sub>2</sub> production and alters the gastric prostanoid profile. *J. Biol. Chem.*, **279**:23229-23237.
258. Guan, Y., Zhang, Y., Schneider, A., Riendeau, D., Mancini, J.A., Davis, L., Komhoff, M., Breyer, R.M. et Breyer, M.D. (2001) Urogenital distribution of a mouse membrane-associated prostaglandin E(2) synthase. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **281**:F1173-F1177.
259. Trebino, C.E., Eskra, J.D., Wachtmann, T.S., Perez, J.R., Carty, T.J. et Audoly, L.P. (2005) Redirection of eicosanoid metabolism in mPGES-1-deficient macrophages. *J. Biol. Chem.*, **280**:16579-16585.
260. Han, R., Tsui, S. et Smith, T.J. (2002) Up-regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by interleukin-1beta in human orbital fibroblasts involves coordinate induction of prostaglandin-endoperoxide H synthase-2 and glutathione-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> synthase expression. *J. Biol. Chem.*, **277**:16355-16364.
261. Kojima, F., Naraba, H., Sasaki, Y., Okamoto, R., Koshino, T. et Kawai, S. (2002) Coexpression of microsomal prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in human rheumatoid synovial cells. *J. Rheumatol.*, **29**:1836-1842.
262. Thoren, S. et Jakobsson, P.J. (2000) Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C<sub>4</sub>. *Eur. J. Biochem.*, **267**:6428-6434.
263. Inoue, W., Matsumura, K., Yamagata, K., Takemiya, T., Shiraki, T. et Kobayashi, S. (2002) Brain-specific endothelial induction of prostaglandin E(2) synthesis enzymes and its temporal relation to fever. *Neurosci. Res.*, **44**:51-61.
264. Catley, M.C., Chivers, J.E., Cambridge, L.M., Holden, N., Slater, D.M., Staples, K.J., Bergmann, M.W., Loser, P., Barnes, P.J. et Newton, R. (2003) IL-1beta-dependent activation of NF-kappaB mediates PGE<sub>2</sub> release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase. *FEBS Lett.*, **547**:75-79.



265. Kojima, F., Naraba, H., Sasaki, Y., Beppu, M., Aoki, H. et Kawai, S. (2003) Prostaglandin  $E_2$  is an enhancer of interleukin-1 $\beta$ -induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, **48**:2819-2828.
266. Cheng, S., Afif, H., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Li, X., Farrajota, K., Lavigne, M. et Fahmi, H. (2004) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced membrane-associated prostaglandin  $E_2$  synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1. *J. Biol. Chem.*, **279**:22057-22065.
267. Li, X., Afif, H., Cheng, S., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Ranger, P. et Fahmi, H. (2005) Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J. Rheumatol.*, **32**:887-895.
268. Quraishi, O., Mancini, J.A. et Riendeau, D. (2002) Inhibition of inducible prostaglandin E(2) synthase by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Pharmacol.*, **63**:1183-1189.
269. Stichtenoth, D.O., Thoren, S., Bian, H., Peters-Golden, M., Jakobsson, P.J. et Crofford, L.J. (2001) Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J. Immunol.*, **167**:469-474.
270. Westman, M., Korotkova, M., af, K.E., Stark, A., Audoly, L.P., Klareskog, L., Ulfgren, A.K. et Jakobsson, P.J. (2004) Expression of microsomal prostaglandin E synthase 1 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.*, **50**:1774-1780.
271. Yoshimatsu, K., Altorki, N.K., Golijanin, D., Zhang, F., Jakobsson, P.J., Dannenberg, A.J. et Subbaramaiah, K. (2001) Inducible prostaglandin E synthase is overexpressed in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, **7**:2669-2674.
272. Blaine, S.A., Meyer, A.M., Hurteau, G., Wick, M., Hankin, J.A., Murphy, R.C., Dannenberg, A.J., Geraci, M.W., Subbaramaiah, K. et Nemenoff, R.A. (2005) Targeted over-expression of mPGES-1 and elevated PGE $_2$  production is not sufficient for lung tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis*, **26**:209-217.
273. Mehrotra, S., Morimiya, A., Agarwal, B., Konger, R. et Badve, S. (2006) Microsomal prostaglandin  $E_2$  synthase-1 in breast cancer: a potential target for therapy. *J. Pathol.*, **208**:356-363.
274. Yoshimatsu, K., Golijanin, D., Paty, P.B., Soslow, R.A., Jakobsson, P.J., DeLellis, R.A., Subbaramaiah, K. et Dannenberg, A.J. (2001) Inducible microsomal prostaglandin E synthase is overexpressed in colorectal adenomas and cancer. *Clin. Cancer Res.*, **7**:3971-3976.
275. Trebino, C.E., Stock, J.L., Gibbons, C.P., Naiman, B.M., Wachtmann, T.S., Umland, J.P., Pandher, K., Lapointe, J.M., Saha, S., Roach, M.L., Carter, D.,

- Thomas, N.A., Durtschi, B.A., McNeish, J.D., Hambor, J.E., Jakobsson, P.J., Carty, T.J., Perez, J.R. et Audoly, L.P. (2003) Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**:9044-9049.
276. Kamei, D., Yamakawa, K., Takegoshi, Y., Mikami-Nakanishi, M., Nakatani, Y., Oh-ishi, S., Yasui, H., Azuma, Y., Hirasawa, N., Ohuchi, K., Kawaguchi, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M. et Kudo, I. (2004) Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin e synthase-1. *J. Biol. Chem.*, **279**:33684-33695.
  277. Engblom, D., Saha, S., Engstrom, L., Westman, M., Audoly, L.P., Jakobsson, P.J. et Blomqvist, A. (2003) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is the central switch during immune-induced pyresis. *Nat. Neurosci.*, **6**:1137-1138.
  278. Mabuchi, T., Kojima, H., Abe, T., Takagi, K., Sakurai, M., Ohmiya, Y., Uematsu, S., Akira, S., Watanabe, K. et Ito, S. (2004) Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is required for neuropathic pain. *Neuroreport*, **15**:1395-1398.
  279. Murakami, M., Nakashima, K., Kamei, D., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Ohmiya, Y., Watanabe, K. et Kudo, I. (2003) Cellular prostaglandin E<sub>2</sub> production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J. Biol. Chem.*, **278**:37937-37947.
  280. Watanabe, K., Ohkubo, H., Niwa, H., Tanikawa, N., Koda, N., Ito, S. et Ohmiya, Y. (2003) Essential 110Cys in active site of membrane-associated prostaglandin E synthase-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**:577-581.
  281. Yamada, T., Komoto, J., Watanabe, K., Ohmiya, Y. et Takusagawa, F. (2005) Crystal structure and possible catalytic mechanism of microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2). *J. Mol. Biol.*, **348**:1163-1176.
  282. Yamada, T. et Takusagawa, F. (2007) PGH<sub>2</sub> degradation pathway catalyzed by GSH-heme complex bound microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase type 2: the first example of a dual-function enzyme. *Biochemistry*, **46**:8414-8424.
  283. Watanabe, K., Ito, S. et Yamamoto, S. (2008) Studies on membrane-associated prostaglandin E synthase-2 with reference to production of 12L-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid (HHT). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**:782-786.
  284. Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M. et Kudo, I. (2000) Molecular identification of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **275**:32775-32782.
  285. Tanioka, T., Nakatani, Y., Kobayashi, T., Tsujimoto, M., Oh-ishi, S., Murakami, M. et Kudo, I. (2003) Regulation of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase by 90-kDa heat shock protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**:1018-1023.

286. Kobayashi, T., Nakatani, Y., Tanioka, T., Tsujimoto, M., Nakajo, S., Nakaya, K., Murakami, M. et Kudo, I. (2004) Regulation of cytosolic prostaglandin E synthase by phosphorylation. *Biochem. J.*, **381**:59-69.
287. Lovgren, A.K., Kovarova, M. et Koller, B.H. (2007) cPGES/p23 is required for glucocorticoid receptor function and embryonic growth but not prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, **27**:4416-4430.
288. Beuckmann, C.T., Fujimori, K., Urade, Y. et Hayaishi, O. (2000) Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochem. Res.*, **25**:733-738.
289. Rowe, J.D., Nieves, E. et Listowsky, I. (1997) Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *Biochem. J.*, **325**:481-486.
290. Yokoyama, C., Yabuki, T., Inoue, H., Tone, Y., Hara, S., Hatae, T., Nagata, M., Takahashi, E.I. et Tanabe, T. (1996) Human gene encoding prostacyclin synthase (PTGIS): genomic organization, chromosomal localization, and promoter activity. *Genomics*, **36**:296-304.
291. Miyata, A., Hara, S., Yokoyama, C., Inoue, H., Ullrich, V. et Tanabe, T. (1994) Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**:1728-1734.
292. Tanabe, T. et Ullrich, V. (1995) Prostacyclin and thromboxane synthases. *J. Lipid. Mediat. Cell Signal.*, **12**:243-255.
293. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. et Nebert, D.W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, **6**:1-42.
294. Hecker, M. et Ullrich, V. (1989) On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **264**:141-150.
295. Chiang, C.W., Yeh, H.C., Wang, L.H. et Chan, N.L. (2006) Crystal structure of the human prostacyclin synthase. *J. Mol. Biol.*, **364**:266-274.
296. Siegle, I., Nusing, R., Brugger, R., Sprenger, R., Zecher, R. et Ullrich, V. (1994) Characterization of monoclonal antibodies generated against bovine and porcine prostacyclin synthase and quantitation of bovine prostacyclin synthase. *FEBS Lett.*, **347**:221-225.













- (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, **348**:883-890.
354. Harris, R.E., Chlebowski, R.T., Jackson, R.D., Frid, D.J., Ascenseo, J.L., Anderson, G., Loar, A., Rodabough, R.J., White, E. et McTiernan, A. (2003) Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative. *Cancer Res.*, **63**:6096-6101.
355. Laine, L. (2003) Gastrointestinal effects of NSAIDs and coxibs. *J. Pain Symptom. Manage.*, **25**:S32-S40.
356. Wolfe, M.M., Lichtenstein, D.R. et Singh, G. (1999) Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N. Engl. J. Med.*, **340**:1888-1899.
357. Singh, G., Ramey, D.R., Morfeld, D., Shi, H., Hatoum, H.T. et Fries, J.F. (1996) Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis. A prospective observational cohort study. *Arch. Intern. Med.*, **156**:1530-1536.
358. Cheng, H.F. et Harris, R.C. (2005) Renal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Curr. Pharm. Des.*, **11**:1795-1804.
359. Harris, R.C. (2006) COX-2 and the kidney. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **47 Suppl 1**:S37-S42.
360. FitzGerald, G.A. et Patrono, C. (2001) The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N. Engl. J. Med.*, **345**:433-442.
361. Day, R., Morrison, B., Luza, A., Castaneda, O., Strusberg, A., Nahir, M., Helgetveit, K.B., Kress, B., Daniels, B., Bolognese, J., Krupa, D., Seidenberg, B. et Ehrich, E. (2000) A randomized trial of the efficacy and tolerability of the COX-2 inhibitor rofecoxib vs ibuprofen in patients with osteoarthritis. Rofecoxib/Ibuprofen Comparator Study Group. *Arch. Intern. Med.*, **160**:1781-1787.
362. Cannon, G.W., Caldwell, J.R., Holt, P., McLean, B., Seidenberg, B., Bolognese, J., Ehrich, E., Mukhopadhyay, S. et Daniels, B. (2000) Rofecoxib, a specific inhibitor of cyclooxygenase 2, with clinical efficacy comparable with that of diclofenac sodium: results of a one-year, randomized, clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee and hip. Rofecoxib Phase III Protocol 035 Study Group. *Arthritis Rheum.*, **43**:978-987.
363. Simon, L.S., Weaver, A.L., Graham, D.Y., Kivitz, A.J., Lipsky, P.E., Hubbard, R.C., Isakson, P.C., Verburg, K.M., Yu, S.S., Zhao, W.W. et Geis, G.S. (1999) Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA*, **282**:1921-1928.

364. Chan, C.C., Boyce, S., Brideau, C., Ford-Hutchinson, A.W., Gordon, R., Guay, D., Hill, R.G., Li, C.S., Mancini, J., Penneton, M., Prasit, P., Rasori, R., Riendeau, D., Roy, P., Tagari, P., Vickers, P., Wong, E. et Rodger, I.W. (1995) Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, L-745,337: a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**:1531-1537.
365. Bombardier, C., Laine, L., Reicin, A., Shapiro, D., Burgos-Vargas, R., Davis, B., Day, R., Ferraz, M.B., Hawkey, C.J., Hochberg, M.C., Kvien, T.K. et Schnitzer, T.J. (2000) Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N. Engl. J. Med.*, **343**:1520-8, 2.
366. Silverstein, F.E., Faich, G., Goldstein, J.L., Simon, L.S., Pincus, T., Whelton, A., Makuch, R., Eisen, G., Agrawal, N.M., Stenson, W.F., Burr, A.M., Zhao, W.W., Kent, J.D., Lefkowitz, J.B., Verburg, K.M. et Geis, G.S. (2000) 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*, **284**:1247-1255.
367. Jackson, L.M., Wu, K.C., Mahida, Y.R., Jenkins, D. et Hawkey, C.J. (2000) Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa. *Gut*, **47**:762-770.
368. Solomon, S.D., McMurray, J.J., Pfeffer, M.A., Wittes, J., Fowler, R., Finn, P., Anderson, W.F., Zauber, A., Hawk, E. et Bertagnolli, M. (2005) Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N. Engl. J. Med.*, **352**:1071-1080.
369. Bresalier, R.S., Sandler, R.S., Quan, H., Bolognese, J.A., Oxenius, B., Horgan, K., Lines, C., Riddell, R., Morton, D., Lanus, A., Konstam, M.A. et Baron, J.A. (2005) Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N. Engl. J. Med.*, **352**:1092-1102.
370. FitzGerald, G.A. (2004) Coxibs and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, **351**:1709-1711.
371. Cullen, L., Kelly, L., Connor, S.O. et Fitzgerald, D.J. (1998) Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**:578-582.
372. McAdam, B.F., Catella-Lawson, F., Mardini, I.A., Kapoor, S., Lawson, J.A. et FitzGerald, G.A. (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**:272-277.
373. Catella, F., Nowak, J. et FitzGerald, G.A. (1986) Measurement of renal and non-renal eicosanoid synthesis. *Am. J. Med.*, **81**:23-29.

374. Topper, J.N., Cai, J., Falb, D. et Gimbrone, M.A., Jr. (1996) Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**:10417-10422.
375. Mitchell, J.A. et Warner, T.D. (2006) COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**:75-86.
376. Flavahan, N.A. (2007) Balancing prostanoid activity in the human vascular system. *Trends Pharmacol. Sci.*, **28**:106-110.
377. Baker, C.S., Hall, R.J., Evans, T.J., Pomerance, A., Maclouf, J., Creminon, C., Yacoub, M.H. et Polak, J.M. (1999) Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**:646-655.
378. Schonbeck, U., Sukhova, G.K., Graber, P., Coulter, S. et Libby, P. (1999) Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.*, **155**:1281-1291.
379. Wong, E., Huang, J.Q., Tagari, P. et Riendeau, D. (2001) Effects of COX-2 inhibitors on aortic prostacyclin production in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, **157**:393-402.
380. Hennekens, C.H. et Borzak, S. (2008) Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Most Traditional Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Cause Similar Moderately Increased Risks of Cardiovascular Disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, **13**:41-50.
381. Mitchell, J.A., Lucas, R., Vojnovic, I., Hasan, K., Pepper, J.R. et Warner, T.D. (2006) Stronger inhibition by nonsteroid anti-inflammatory drugs of cyclooxygenase-1 in endothelial cells than platelets offers an explanation for increased risk of thrombotic events. *FASEB J.*, **20**:2468-2475.
382. Riendeau, D., Aspiotis, R., Ethier, D., Gareau, Y., Grimm, E.L., Guay, J., Guiral, S., Juteau, H., Mancini, J.A., Methot, N., Rubin, J. et Friesen, R.W. (2005) Inhibitors of the inducible microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase (mPGES-1) derived from MK-886. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**:3352-3355.
383. Cote, B., Boulet, L., Brideau, C., Claveau, D., Ethier, D., Frenette, R., Gagnon, M., Giroux, A., Guay, J., Guiral, S., Mancini, J., Martins, E., Masse, F., Methot, N., Riendeau, D., Rubin, J., Xu, D., Yu, H., Ducharme, Y. et Friesen, R.W. (2007) Substituted phenanthrene imidazoles as potent, selective, and orally active mPGES-1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**:6816.

384. Pelcman, B., Olofsson, K., Katkevics, M., Ozola, V., Suna, E., Kalvins, I. et Trapencieris, P. Indoles useful in the treatment of inflammation. Brevet # WO/2006/077364. 7 juillet 2007.
385. Xu, D., Rowland, S.E., Clark, P., Giroux, A., Côté, B., Guiral, S., Ducharme, Y., Friesen, R.W., Methot, N., Mancini, J.A., Audoly, L.P. et Riendeau, D. (2008) Inhibition of mPGES-1-dependent PGE<sub>2</sub> is as effective as NSAIDs in relieving fever and inflammatory pain. (en préparation).
386. Cheng, Y., Wang, M., Yu, Y., Lawson, J., Funk, C.D. et FitzGerald, G.A. (2006) Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *J. Clin. Invest.*, **116**:1391-1399.
387. Jia, Z., Zhang, A., Zhang, H., Dong, Z. et Yang, T. (2006) Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 increases sensitivity to salt loading and angiotensin II infusion. *Circ. Res.*, **99**:1243-1251.
388. Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S. et Kudo, I. (1999) Functional coupling between various phospholipase A<sub>2</sub>s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.*, **274**:3103-3115.
389. Camacho, M., Gerboles, E., Escudero, J.R., Anton, R., Garcia-Moll, X. et Vila, L. (2007) Microsomal prostaglandin E synthase-1, which is not coupled to a particular cyclooxygenase isoenzyme, is essential for prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Thromb. Haemost.*, **5**:1411-1419.
390. Bezugla, Y., Kolada, A., Kamionka, S., Bernard, B., Scheibe, R. et Dieter, P. (2006) COX-1 and COX-2 contribute differentially to the LPS-induced release of PGE<sub>2</sub> and TxA<sub>2</sub> in liver macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **79**:93-100.
391. Ueno, N., Murakami, M., Tanioka, T., Fujimori, K., Tanabe, T., Urade, Y. et Kudo, I. (2001) Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, **276**:34918-34927.
392. Brock, T.G., McNish, R.W. et Peters-Golden, M. (1999) Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, **274**:11660-11666.
393. Caughey, G.E., Cleland, L.G., Penglis, P.S., Gamble, J.R. et James, M.J. (2001) Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J. Immunol.*, **167**:2831-2838.
394. Liou, J.Y., Shyue, S.K., Tsai, M.J., Chung, C.L., Chu, K.Y. et Wu, K.K. (2000) Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **275**:15314-15320.

395. Shyue, S.K., Tsai, M.J., Liou, J.Y., Willerson, J.T. et Wu, K.K. (2001) Selective augmentation of prostacyclin production by combined prostacyclin synthase and cyclooxygenase-1 gene transfer. *Circulation*, **103**:2090-2095.
396. Lin, H., Lin, T.N., Cheung, W.M., Nian, G.M., Tseng, P.H., Chen, S.F., Chen, J.J., Shyue, S.K., Liou, J.Y., Wu, C.W. et Wu, K.K. (2002) Cyclooxygenase-1 and bicistronic cyclooxygenase-1/prostacyclin synthase gene transfer protect against ischemic cerebral infarction. *Circulation*, **105**:1962-1969.
397. Suchanek, M., Radzikowska, A. et Thiele, C. (2005) Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat. Methods*, **2**:261-267.
398. FitzGerald, G.A. (2002) Cardiovascular pharmacology of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. *Am. J. Cardiol.*, **89**:26D-32D.
399. Stanfield, K.M., Khan, K.N. et Gralinski, M.R. (2001) Localization of cyclooxygenase isozymes in cardiovascular tissues of dogs treated with naproxen. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **80**:309-314.
400. Murphey, L.J., Williams, M.K., Sanchez, S.C., Byrne, L.M., Csiki, I., Oates, J.A., Johnson, D.H. et Morrow, J.D. (2004) Quantification of the major urinary metabolite of PGE<sub>2</sub> by a liquid chromatographic/mass spectrometric assay: determination of cyclooxygenase-specific PGE<sub>2</sub> synthesis in healthy humans and those with lung cancer. *Anal. Biochem.*, **334**:266-275.
401. Tsuboi, H., Sugimoto, Y., Kainoh, T. et Ichikawa, A. (2004) Prostanoid EP<sub>4</sub> receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **322**:1066-1072.
402. Arner, P. (2005) Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **19**:471-482.
403. Avram, M.M., Avram, A.S. et James, W.D. (2007) Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **56**:472-492.