

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**LES EFFETS IMMUNOMODULATOIRES DE LA CURCUMINE SUR
LA RÉPONSE INFLAMMATOIRE: ÉTUDE DE LA PHYSIOLOGIE
DES NEUTROPHILES *IN VITRO* ET *IN VIVO*.**

Par
Francis Antoine

Thèse présentée pour l'obtention du grade
de Philosophiæ doctor, (Ph. D.)
en Biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examinateur interne

Jacques Bernier, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Lucie Lamontagne, PhD
Université du Québec à Montréal

Examinateur externe

Caroline Gilbert, PhD
Centre Hospitalier de l'Université Laval

Directeur de recherche

Denis Girard, PhD
INRS-Institut Armand-Frappier

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	5
LISTE DES ANNEXES	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
RÉSUMÉ	10
INTRODUCTION.....	11
PREMIÈRE PARTIE: SYNTHÈSE	17
1. L'inflammation	18
1.1 Généralités.....	18
1.2 La régulation de l'inflammation.....	19
1.3 L'inflammation chronique.....	22
1.4 Les maladies inflammatoires chroniques associées aux neutrophiles...	25
1.5 Les modèles inflammatoires.....	27
2. Les neutrophiles.....	29
2.1 Développement et maturation des neutrophiles.....	29
2.2 La neutropénie.....	32
2.3 La physiologie des neutrophiles.....	32
2.3.1 La production des réactifs oxygénés.....	33
2.3.2 La sécrétion des cytokines et des chimiokines.....	36
2.3.3 La migration des neutrophiles au site inflammatoire.....	38
2.3.4 Les granules des neutrophiles.....	40
2.3.5 La phagocytose des neutrophiles.....	42
2.4 L'apoptose des neutrophiles.....	44
2.4.1 La voie intrinsèque.....	48
2.4.2 La voie extrinsèque.....	50
2.4.3 La voie du stress du réticulum endoplasmique.....	51

3.	Le curcuma, une plante médicinale.....	54
3.1	La curcumine.....	57
3.2	La curcumine et le stress oxydatif.....	59
3.3	Effet de la curcumine sur les facteurs de transcriptions.....	61
3.4	Effet de la curcumine sur l'apoptose.....	62
3.5	Essais cliniques et précliniques portant sur la curcumine.....	63
DEUXIÈME PARTIE: ARTICLES.....		68
Article 1.		
<i>Mechanisms involved in curcumin-induced human neutrophil apoptosis: Evidence that curcumin activates the endoplasmic reticulum stress-induced cell apoptosis pathway.....</i>		69
Article 2.		
<i>Curcumin inhibits agent-induced human neutrophils functions in vitro and lipopolysaccharide-induced neutrophilic infiltration in vivo.....</i>		92
Article 3.		
<i>Curcumin increases gelatinase activity in human neutrophils by a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-independent mechanism.</i>		117
DISCUSSION DES RÉSULTATS.....		137
4.1	Effets de la curcumine sur la physiologie des neutrophiles.....	138
4.2	Effets de la curcumine sur l'apoptose des neutrophiles.....	144
4.3	Effets de la curcumine <i>in vivo</i>	148
CONCLUSION.....		152
ANNEXES.....		157
RÉFÉRENCES.....		185

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier très chaleureusement mon directeur de recherche, Denis Girard, pour sa motivation contagieuse et son dynamisme exemplaire, mais surtout pour la confiance qu'il m'a accordée durant toutes ces années à travailler sur le projet. Sans lui, rien n'aurait été possible. Il a cru en moi et je lui en suis infiniment reconnaissant.

Je ne pourrai jamais oublier les collègues qui ont partagés temps et savoir durant ces années. Un remerciement spécial à Michelle Poirier, Francis Vallières, Kim Babin, David Gonçalves, Jean-Christophe Simard, Bruno Johnson et Rafael Pitù qui ont su inspirer mon parcours académique et le remplir avec encore plus de passions.

Je tiens également à remercier l'INRS-Institut Armand-Frappier de m'avoir permis de poursuivre un cursus académique de haut niveau scientifique et à l'avant-garde des défis qui nous attendent dans le futur. Je tiens à remercier tout le personnel cadre de l'INRS, leur présence a fait de mon passage un séjour amicalement agréable.

Le plus gros merci revient à mon père, Patrick, parce que son soutien m'est aujourd'hui très valeureux. C'est une chance inouïe que de participer au développement de la société de cette façon. Cette chance, elle est donnée directement par le soutien financier, d'une part, mais surtout par le soutien moral qui incite à se surpasser. Je lui en serai éternellement reconnaissant. Merci à ma mère, Ellen, elle m'a donné toutes les bonnes qualités dont j'avais besoin pour percer dans le domaine : persévérence, générosité, curiosité et passion.

Un dernier merci, mais non le moindre, à tous mes proches et amis, pour l'être et le rester. Merci aussi parce qu'ils ont tous su, à leur façon, contribuer au maintien de ma santé mentale et affective durant ce long parcours qu'est le doctorat.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classement des cytokines sécrétées par les neutrophiles.....	37
Tableau II : Composition des granules des neutrophiles (membrane et matrice).....	41
Tableau III : Les récepteurs de phagocytose dans l'immunité innée.....	44
Tableau IV : Essais cliniques portant sur les effets anti-inflammatoires de la curcumine	66
Tableau V : Essais cliniques portant sur les effets anticancéreux de la curcumine.....	67
Tableau VI: Immunomodulatory effects and molecular targets of curcumin in neutrophils.....	180

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Instauration et résolution de l'inflammation aiguë.....	20
Figure 2: Développement et maturation des neutrophiles.....	30
Figure 3: Structure et activation de Nox2 NADPH oxydase.....	35
Figure 4: Extravasation des neutrophiles.....	39
Figure 5: Importance de l'apoptose et de la nécrose en inflammation.....	45
Figure 6: Importance du taux d'apoptose des neutrophiles.....	47
Figure 7: Schématisation des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque.....	49
Figure 8: Réponses au stress du réticulum endoplasmique.....	53
Figure 9: <i>Curcuma longa</i>	55
Figure 10: Structures moléculaires de la curcumine.....	58
Figure 11: Modulation of the human neutrophils apoptotic rate by curcumin.....	80
Figure 12: Curcumin accelerates the apoptosis of neutrophils in a concentration-dependent manner	82

Figure 13: Curcumin induces the processing of caspase-3 and the cleavage of cytoskeletal proteins.....	83
Figure 14: Curcumin inhibits <i>de novo</i> protein synthesis and protein ubiquitination in human neutrophils.....	85
Figure 15: Curcumin activates PERK and eIF2 α but decreases the expression of HSP70 and HSP90 in neutrophils.....	87
Figure 16: Curcumin inhibits the capacity of fMLP and LPS to delay human neutrophils apoptosis.....	103
Figure 17: Curcumin inhibits PMA-induced ROS production in human neutrophils....	104
Figure 18: Curcumin inhibits the ability of LPS to increase cytokines production in human neutrophils.....	106
Figure 19: Curcumin is an inhibitor of LPS-induced IL-8 production.....	107
Figure 20: Evidence that curcumin is an inhibitor of the transcription factor NF- κ B activity induced by LPS in human neutrophils.....	109
Figure 21: Curcumin inhibits LPS-induced neutrophilic inflammation <i>in vivo</i>	110
Figure 22: Curcumin decreases the LPS-induced local production of cytokines <i>in vivo</i>	111
Figure 23: Curcumin induces cell surface expression of the three granule markers CD35, CD63 and CD66b, in human PMNs.....	126
Figure 24: Curcumin increases the expression of MMP-9 and the gelatinase activity in the extracellular milieu.....	127
Figure 25: Curcumin does not further increased fMLP-induced p38 MAPK in human PMNs and does not increase MMP-9 protein expression by a p38 MAPK-dependent mechanism.....	129
Figure 26: The ability of curcumin to increase gelatinase activity is unaffected by the p38 MAPK inhibitor.....	130
Figure 27: Curcumin enhances human PMN phagocytosis.....	131
Figure 28: Immunomodulation of the functions and physiology of neutrophils by curcumin.....	183

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Sécrétion des cytokines et des chimiokines par les neutrophiles.....	158
Annexe II : L'apoptose induite ou spontanée des neutrophiles est affectée par la catalase et le GM-CSF.....	159
Annexe III : Effets de la curcumine sur la sécrétion des cytokines <i>in vivo</i>.....	160
Annexe IV : Chapitre de livre - Curcumin : Synthesis, emerging role in pain management and health implications - Curcumin and inflammation : the role of neutrophils.....	161

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1
ATF6	activating transcription factor 6
ATO	arsenic trioxide
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
CHX	cycloheximide
DMSO	dimethylsulphoxyde
eIF2 α	eukaryotic translation initiation factor 2a
ELISA	enzyme-linked immunosorbant assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ER	endoplasmic reticulum
FcRs	Fc receptors
FITC	fluorescein isothiocyanate
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
G-CSF	granulocyte-colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
GPCR	G-protein-coupled receptor
GRO	growth related gene product
GTP	guanosine triphosphate
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heat shock protein
ICAM	intercellular adhesion molecule
Ig	immunoglobulin
INF	interferon
IRE1 α	inositol-requiring protein 1a
LAD	leukocyte adhesion deficiency
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	lipopolysaccharide

LTs	leucotrienes
Mac-1	macrophage-1 antigen
MAP	mitogen-activated protein
MCP1	monocyte chemotactic protein 1
MIP	macrophage infiltrating protein
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NET	neutrophil extracellular trap
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAF	platelet-activating factor
PBS	phosphate buffer saline
PERK	protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum (ER) kinase
PGs	prostaglandins
PICD	phagocytosis-induced cell death
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMN	polymorphonuclear neutrophil
PPAR- γ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
p/s	penicillin / streptomycin
PVDF	polyvinylidene fluoride
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SA	spontaneous apoptosis
SDS-PAGE	sodium-dodecyl-
SEM	standard error
TBS	tris-buffer saline
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R	tumor necrosis factor receptor
UPR	unfolded protein response
VCAM	vascular endothelial adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
XBP	X box-binding protein
X-CGD	X-linked chronic granulomatous disease

RÉSUMÉ

Aujourd’hui, les maladies inflammatoires chroniques constituent un enjeu majeur en santé humaine. Le mode de vie et l’environnement de la société occidentale mènent à plusieurs problèmes cardiovasculaires, respiratoires, digestifs et neurodégénératifs. La médecine moderne offre plusieurs traitements basés la plupart du temps sur l’inhibition pharmacologique de processus inflammatoires normaux. Leurs recours à long terme sont parfois accompagnés de sérieux effets secondaires pouvant aggraver la santé de l’individu. Récemment, une molécule appelée curcumine fait l’objet de nombreuses études et semble présenter des effets anti-inflammatoires et proapoptotiques. Or, les effets de cette molécule n’avaient jamais été étudiés en profondeur sur la physiologie et l’apoptose des neutrophiles. La présente étude montre que la curcumine possède d’importants effets immunomodulateurs sur les neutrophiles. En résumé, la curcumine inhibe la production de réactifs oxygénés, la sécrétion des cytokines MIP-1 α , MIP-1 β et IL-8 ainsi que l’activation du facteur de transcription NF- κ B en conditions inflammatoires. Nous avons aussi pu montrer que la curcumine induit l’apoptose, la dégranulation et le processus de phagocytose des neutrophiles. De plus, afin de déterminer les mécanismes d’actions de cette molécule, nous avons étudié l’activation de la voie du stress du réticulum endoplasmique. Finalement, les effets de la curcumine ont été confirmés à l’aide du modèle inflammatoire murin de la poche d’air *in vivo*. En conclusion, les effets proapoptotiques et immunomodulateurs de la curcumine sur les neutrophiles pourraient expliquer les effets bénéfiques de cette molécule sur les maladies inflammatoires et autoimmunes rapportées dans la littérature scientifique des dernières décennies.

INTRODUCTION

La base du projet repose sur le fait que la curcumine possède des effets anti-inflammatoires, incluant notamment des effets proapoptotiques. L'absence de toxicité observée par la curcumine se traduirait par l'induction de l'apoptose des neutrophiles (qui paradoxalement constitue en soit un mécanisme cytotoxique). L'absence d'inflammation observée en présence d'apoptose serait intimement reliée aux effets bénéfiques de la curcumine. En supposant que la curcumine cible les neutrophiles, elle agirait donc de façon efficace sur les mécanismes impliqués dans les processus inflammatoires. Partant de la prémissse que les neutrophiles constituent une cause majeure de l'inflammation chez l'individu, on est en droit de se questionner des effets possibles de la curcumine sur les neutrophiles. Les effets probables de la curcumine sur la physiologie des neutrophiles seraient donc potentiellement la raison principale de ses actions bénéfiques sur la santé humaine. Or, très peu de recherche ont été effectuées sur ce sujet, malgré l'abondance de la littérature scientifique concernant la curcumine.

Une présence soutenue des neutrophiles dans les tissus est souvent reliée à leur activation excessive et ceci peut générer plus de dommages que le stimulus primaire. Ce procédé est souvent associé à l'inflammation chronique et cela représente une problématique considérable. Ainsi, l'inflammation chronique demeure un problème majeur en santé humaine. Aujourd'hui, l'apoptose des neutrophiles est considérée comme le mécanisme le plus crucial par lequel la résolution de l'inflammation s'effectue. L'apoptose des neutrophiles peut être modulée par plusieurs agents. Par conséquent, la régulation de celle-ci est un élément critique dans le maintien de l'homéostasie. L'activation de ce processus est donc maintenant considérée par plusieurs dans le développement des nouvelles stratégies thérapeutiques. Étant donné les effets proapoptotiques de la curcumine et l'importance de l'apoptose des neutrophiles, nous avons décidé d'investiguer plus en profondeur les effets de la curcumine sur l'apoptose

des neutrophiles. Effectivement, nous avons concentré nos efforts de recherche sur la physiologie des neutrophiles en réponse à la curcumine, qui représente un axe de recherche très peu documenté. Nos résultats ont apporté des explications supplémentaires et originales aux effets anti-inflammatoires de la curcumine déjà observés dans les laboratoires de recherche biomédicale depuis maintenant plusieurs années.

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier les mécanismes d'induction de l'apoptose afin d'en connaître davantage sur les modes d'action de la curcumine à l'intérieur des neutrophiles. Le projet de recherche s'appuie donc en grande partie sur une première étude réalisée en 2005 qui rapportait que la curcumine induisait l'apoptose des neutrophiles par un mécanisme dépendant de la caspase-3 et de la MAPK p38 (Hu *et al.*, 2005). En addition à cela, quelques années plus tard, une autre équipe a démontré que la curcumine induisait la voie apoptotique du stress du réticulum endoplasmique chez les cellules HL-60, les précurseurs myéloïdes des neutrophiles (Pae *et al.*, 2007). Notre équipe, travaillant déjà sur la nouvelle voie apoptotique du stress du réticulum endoplasmique, s'est donc penchée sur l'implication de la curcumine dans l'induction de cette voie chez les neutrophiles humains. Ainsi, afin de répondre à l'objectif principal, nous avons élaboré trois hypothèses qui découlent d'une hypothèse centrale voulant que la curcumine, connue pour son potentiel anti-inflammatoire, affecte les réponses fonctionnelles des neutrophiles humains.

Notre première hypothèse stipule que la curcumine induit l'apoptose des neutrophiles. Afin de vérifier cette hypothèse, le premier objectif principal de cette étude est d'évaluer les effets de la curcumine sur l'activation de la voie apoptotique du stress du réticulum endoplasmique ainsi que d'évaluer l'apoptose des neutrophiles dans un contexte

inflammatoire. En répondant au premier objectif, nous serons en mesure d'établir de nouveaux mécanismes d'induction de l'apoptose chez les neutrophiles, principalement celui induit par la curcumine via le stress du réticulum endoplasmique, et ainsi améliorer les connaissances dans ce domaine. L'article 1 présente les résultats sur l'induction de l'apoptose des neutrophiles par la curcumine via la voie du stress du réticulum endoplasmique. Les résultats obtenus sur l'induction de l'apoptose des neutrophiles par la curcumine dans un contexte inflammatoire sont présentés dans l'article 2.

Puisque la littérature scientifique concernant les effets de la curcumine sur la physiologie des neutrophiles est fragmentaire, voire inexiste, nous nous sommes, dans un deuxième temps, intéressé aux autres fonctions cellulaires des neutrophiles en réponse à la curcumine. Les neutrophiles, grâce à leur physiologie particulière et unique, sont capables d'exercer plusieurs réponses cellulaires comme la production de réactifs oxygénés, la phagocytose, la dégranulation et la production de cytokines. Dans un contexte inflammatoire, ces fonctions peuvent être affectées et participer de façon active à l'exacerbation ou à la régulation de l'inflammation. Donc, par souci d'élucider les mécanismes sous-jacents aux activités anti-inflammatoires de la curcumine et afin de pleinement comprendre son mode d'action dans l'inflammation, nous avons décidé d'étudier ses effets sur la physiologie des neutrophiles.

Nous proposons donc une seconde hypothèse stipulant que la curcumine affecte la physiologie des neutrophiles et que cette affection pourrait expliquer les capacités anti-inflammatoires de ces derniers lors de son exposition. Pour ce faire, nous proposons de caractériser les effets de la curcumine sur les fonctions cellulaires (*i.e.* production de réactifs oxygénés, production des cytokines, activation de NF- κ B et la dégranulation) des neutrophiles dans un contexte inflammatoire. En répondant à ce deuxième objectif,

nous serons en mesure de déterminer de nouveaux mécanismes immunomodulatoires de la curcumine chez les neutrophiles en contexte inflammatoire et par conséquent contribuer à l'avancement des connaissances dans ce domaine. Les effets de la curcumine sur la physiologie des neutrophiles en contextes inflammatoires sont réunis majoritairement dans l'article 2. L'article 3 révèle les résultats obtenus concernant les réponses fonctionnelles des neutrophiles en réponse à la curcumine pour la dégranulation et la phagocytose.

Parce que le recrutement des neutrophiles au site inflammatoire et leur présence dans les tissus est souvent associé au développement des pathologies inflammatoires, il serait intéressant d'évaluer la capacité de la curcumine à influencer ce processus. Or, il se trouve que la curcumine a déjà fait l'objet de nombreuses investigations à l'aide de modèles inflammatoires *in vivo* et semble dans la plupart des cas conférer des effets bénéfiques pour la santé des animaux. Dans le souci de vouloir confirmer l'utilisation potentielle de la curcumine au bénéfice de la santé humaine, il serait pertinent d'étudier l'effet de la curcumine à l'aide d'un modèle murin n'ayant jamais été testé auparavant (Goncalves *et al.*, 2011). De plus, le modèle inflammatoire murin nous permettra de confirmer les résultats obtenus *in vitro*. Finalement, la conjugaison des résultats *in vitro* et *in vivo* nous permettra de tracer un portrait global des effets de la curcumine sur les neutrophiles dans différents contextes inflammatoires.

Conséquemment, nous émettons une troisième hypothèse stipulant que la curcumine affecte la réponse inflammatoire *in vivo* en ciblant les neutrophiles. Pour ce faire, nous avons étudié les effets de la curcumine sur l'infiltration leucocytaire et sur la sécrétion des cytokines à l'intérieur du modèle inflammatoire murin de la poche d'air. En répondant à ce troisième objectif, nous serons en mesure de confirmer la portée

thérapeutique de la curcumine et ainsi contribuer à l'établissement d'une potentielle utilisation de la curcumine pour contrer l'inflammation. Les résultats *in vivo* des effets de la curcumine sur l'infiltration leucocytaire et sur la sécrétion des cytokines sont rapportés dans l'article 2.

La première partie de la thèse est constituée de la revue de la littérature qui est composée de trois chapitres principaux traitant respectivement de l'inflammation, des neutrophiles et de la curcumine. Elle présente un aperçu général des plus récentes connaissances reliant les neutrophiles et la curcumine à l'inflammation. L'apoptose et les réponses fonctionnelles des neutrophiles pourraient jouer un rôle important dans les effets anti-inflammatoires de la curcumine, mais jusqu'à présent les données sur le sujet ne sont qu'émergentes.

La deuxième partie de la thèse est constituée des articles qui ont pour but d'apporter de nouvelles compréhensions sur les mécanismes anti-inflammatoires de la curcumine. Cette deuxième partie de cette thèse est suivie par une discussion des résultats dans laquelle sont présentés des éléments d'explications aux phénomènes observés. Elle rassemble les conclusions tirées des différents articles et tente d'apporter des perspectives à ces explications.

Cette étude faisant l'objet de ce projet de recherche apporte une explication originale aux effets anti-inflammatoires de la curcumine observées précédemment. Finalement, la thèse se termine par une courte conclusion et une ouverture sur les enjeux et les avenues thérapeutiques de la curcumine en santé humaine.

PREMIÈRE PARTIE: SYNTHÈSE

1. L'inflammation

1.1 Généralités

L'inflammation est le terme employé pour décrire la réponse d'un tissu vis-à-vis un stress (Ferrero-Miliani *et al.*, 2007). Le rôle principal de l'inflammation est de limiter les effets blessants du stimulus en tentant de l'éliminer et en débutant le processus de réparation tissulaire. La réponse inflammatoire est une série d'événements prenant place dans une séquence prévisible. Les cellules du système immunitaire et du tissu conjonctif jouent un rôle spécifique à différentes étapes durant la réponse inflammatoire. Le but ultime de l'inflammation est de rétablir la fonction et l'architecture normale du tissu.

L'inflammation est un processus normal et essentiel. Il s'agit d'une série d'événements cellulaires agissant de façon rapide et locale vis-à-vis un stress. Tout ce qui peut causer un dommage tissulaire associé avec de la nécrose cellulaire mène à une réponse inflammatoire. La nécrose cellulaire peut se manifester à la suite d'une infection, un traumatisme, une ischémie, une brûlure chimique ou physique, à des radiations, etc. Les débris de cellules nécrotiques, peu importe de quel stimulus primaire ils sont issus, possèdent un potentiel inflammatoire.

La séquence d'événements prenant place durant une réponse inflammatoire se manifeste via cinq signes cliniques, soit : la chaleur (*calor*), la rougeur (*rubor*), l'œdème (*tumor*), la douleur (*dolor*) et finalement la perte de la fonction du tissu (*functio laesa*). Une réponse inflammatoire complète se développe sur une période de quelques minutes à quelques heures et possède trois éléments : la dilatation vasculaire,

l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'activation des neutrophiles suivie de leur migration dans les tissus. La chaleur et la rougeur sont le résultat de l'augmentation du flux sanguin au site inflammatoire. L'oedème est causé par l'accumulation de fluides et la douleur est due à la présence de médiateurs chimiques qui stimulent les terminaisons nerveuses (Ferrero-Miliani *et al.*, 2007). La perte de la fonction du tissu est causée par plusieurs facteurs mais le plus souvent elle est une conséquence de la chronicité de l'inflammation qui entraîne la destruction du tissu.

1.2 La régulation de l'inflammation

La figure 1 montre de façon schématisée la cinétique des événements cellulaires associés à l'inflammation. La séquence d'activation cellulaire est dictée par la sécrétion séquentielle des médiateurs inflammatoires. Rapidement, les amines vasoactives et les médiateurs lipidiques induisent la formation de l'oedème et de l'exsudat; suivie de l'expression des cytokines et des chimiokines qui activent l'endothélium et la migration des neutrophiles. Suite à l'infiltration des neutrophiles dans les tissus, les médiateurs anti-inflammatoires, comme les lipoxines (LXs) et les prostaglandines cyclopentenones (cyPGs), atténuent la migration cellulaire et favorisent l'apoptose et l'élimination des leucocytes du site inflammatoire. Finalement, la phagocytose des cellules apoptotiques par les cellules mononucléaires stimule la sécrétion supplémentaire de médiateurs anti-inflammatoires, comme le TGF- β 1 (Lawrence *et al.*, 2002).

Effectivement, la réponse inflammatoire doit être stoppée de façon appropriée afin d'empêcher les dommages tissulaires collatéraux. Une défaillance dans l'arrêt de l'inflammation mène à l'inflammation chronique et à la destruction cellulaire.

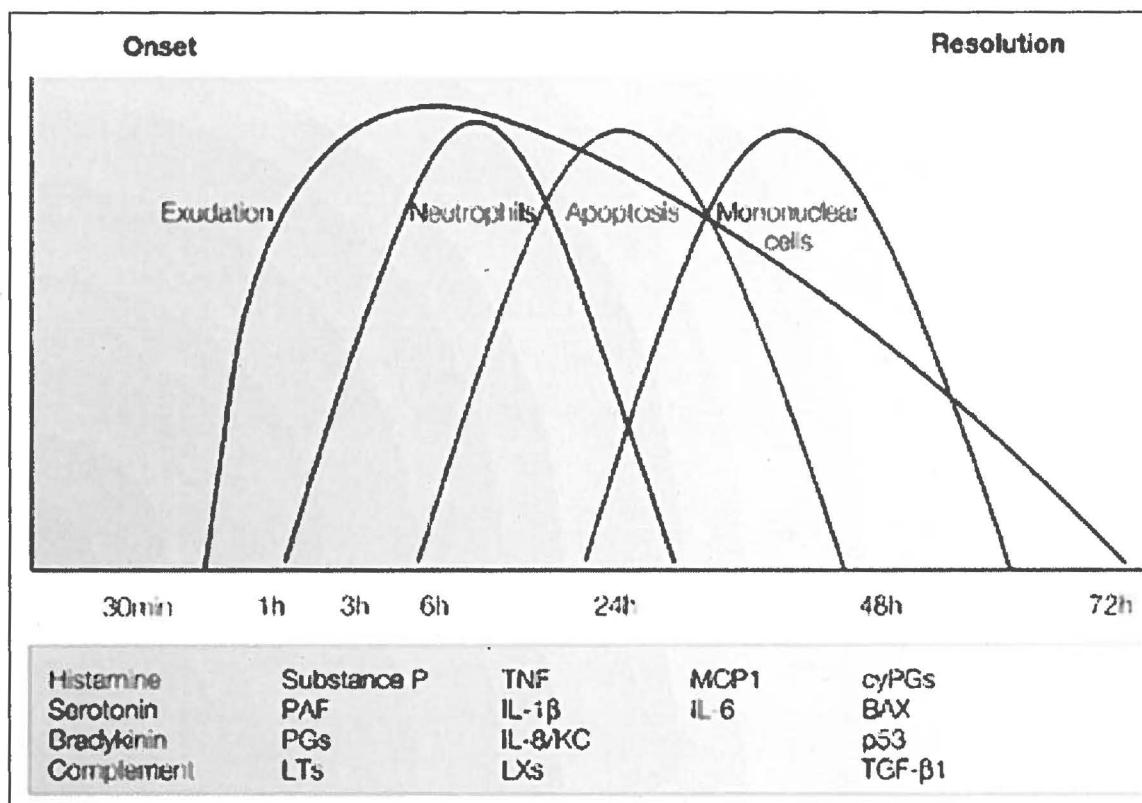


Figure 1: Instauration et résolution de l'inflammation aiguë. Les neutrophiles sont les premières cellules à migrer au site inflammatoire. Leur infiltration est stoppée par la sécrétion de médiateurs lipidiques, comme les lipoxines (LXs). Ensuite, la phase apoptotique des neutrophiles est déclenchée et attire les cellules mononucléaires, comme les macrophages. La phagocytose des neutrophiles apoptotiques (efferocytose) est accompagnée par la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires comme le TGF- β 1. BAX: BCL-2-associated X protein, IL: interleukine, LTs: leukotrienes, MCP1: monocyte chemotactic protein 1 (CCL2), PAF: platelet-activating factor, PGs: prostaglandines, TNF: tumor-necrosis factor. Source: (Lawrence *et al.*, 2002).

La résolution de l'inflammation est effectuée par plusieurs mécanismes distincts et coexistants. Les mécanismes de résolution de l'inflammation sont dépendants du contexte et incluent : la production et la sécrétion du facteur de croissance et de transformation (transforming growth factor, TGF- β) (Ashcroft, 1999); la production et la sécrétion de l'interleukine-10 (IL-10) (Sato *et al.*, 1999); la production de lipoxines (dérivés de l'acide arachidonique) anti-inflammatoires (Serhan, 2008); la baisse de la production de molécules inflammatoires et de leurs métabolites (leucotriènes,

prostaglandines); l'augmentation de protéines anti-inflammatoires comme l'antagoniste au récepteur de l'interleukine-1 (IL-1ra) (Moll *et al.*, 2013) ou de la forme soluble du récepteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor receptor, TNFR) (Apostolaki *et al.*, 2010); la désensibilisation des récepteurs et la baisse de leur activité (Lombardi *et al.*, 2002); la dégradation des cytokines par les métalloprotéases matricielles (McQuibban *et al.*, 2000); l'apoptose des cellules proinflammatoires (Greenhalgh, 1998). L'issue finale de la réponse inflammatoire se décidera en fonction des cellules immunitaires présentes et de leur état d'activation par le microenvironnement présent *in situ*.

L'inflammation aiguë se résout par un mécanisme encore teinté d'incertitude (Serhan *et al.*, 2005). Les informations les plus récentes révèlent que le sort d'une réponse inflammatoire se déciderait dans les premières heures par un programme de résolution actif et coordonné. Les neutrophiles sont présents dès les premiers instants au site inflammatoire et jouent un rôle déterminant dans l'instauration, la prolongation et la résolution d'une réponse inflammatoire. Par exemple, après leur migration dans les tissus, les granulocytes promeuvent l'aiguillage de la métabolisation de l'acide arachidonique, *i.e.* des prostaglandines et leucotriènes en lipoxines, établissant ainsi la séquence de cessation. Le recrutement des neutrophiles cesse donc et le programme de mort cellulaire (apoptose) est déclenché. Conséquemment, cela mène à l'élimination des neutrophiles apoptotiques qui subissent la phagocytose des macrophages (efférocytose). Ce processus est accompagné de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et réparatrices (TGF- β 1) (Serhan *et al.*, 2005) contribuant au processus de cicatrisation.

1.3 L'inflammation chronique

L'inflammation chronique est souvent associée avec la persistance d'un antigène. Certains microbes ont des composants dans leur paroi leur permettant de résister à la phagocytose. Ces derniers induisent souvent une inflammation chronique qui se termine par des dommages tissulaires importants (DeFranco *et al.*, 2007). D'autres types d'inflammations chroniques sont causés par des maladies autoimmunes se caractérisant par la présence d'auto-anticorps activant continuellement les lymphocytes T. Aussi, la présence d'une tumeur cancéreuse peut provoquer des dommages tissulaires importants causés par l'inflammation chronique qu'elle induit (Kindt *et al.*, 2007). L'activation et l'infiltration des macrophages dans les tissus est un incontournable de l'inflammation chronique. Les cytokines produites par les macrophages activés stimulent la prolifération des fibroblastes et la production de collagène. Ce processus génère la formation d'un tissu cicatriciel nommé fibrose. Même si la fibrose est un processus de reconstruction du tissu, elle peut compromettre la fonction de ce dernier. Aussi, l'inflammation chronique génère souvent la formation d'une masse «tumeur» appelée granulome (Kindt *et al.*, 2007). Cette masse cellulaire est constituée de macrophages activés entourés de lymphocytes. Deux cytokines, IFN- γ et TNF- α , jouent un rôle central dans le développement de l'inflammation chronique. Les lymphocytes Th1, les cellules NK et les cellules T cytotoxiques produisent de l'IFN- γ alors que les macrophages activés produisent du TNF- α (DeFranco *et al.*, 2007). Les macrophages activés par ces cytokines produisent des enzymes protéolytiques et des produits réactifs de l'oxygène et de l'azote responsables des dommages aux tissus environnants. Finalement, le TNF- α et l'IFN- γ agissent en synergie pour augmenter l'expression de molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1, sélectine-E) et du complexe majeur d'histocompatibilité de

classe I (CMH-I). L'augmentation de ces dernières protéines d'interaction cellule-cellule favorise l'arrivée de cellules sur le site d'inflammation (Kindt *et al.*, 2007).

L'inflammation chronique est un problème de santé souvent rencontré dans les pays dits développés. Le mode de vie (l'alimentation et l'exercice physique) et l'environnement sont souvent désignés comme les causes de ces problèmes de santé humaine. Il arrive aussi que des maladies inflammatoires chroniques soient le résultat d'une défaillance génétique héréditaire affectant la physiologie normale des neutrophiles. C'est pourquoi dans le souci d'établir de nouvelles stratégies thérapeutique à l'égard de l'inflammation, il est important de considérer la physiologie des neutrophiles. Leur physiologie particulière est parfois la cause de complications immunitaires nécessitant un suivi médical constant pour ne pas compromettre la santé de l'individu.

Les neutrophiles sont parfois impliqués dans les maladies inflammatoires chroniques. Normalement, un programme de résolution coordonné s'initie dans les premières heures de la réponse inflammatoire. La diminution progressive du recrutement des neutrophiles dans les tissus «inflammés» est associée avec la disparition du stimulus étranger ayant causé la réponse inflammatoire primaire. Suite à quoi, les neutrophiles s'engagent dans la mort cellulaire programmée (apoptose) et rétablissent au niveau basal la population leucocytaire dans les tissus. Peu à peu, la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages fait diminuer la réponse inflammatoire et rétablit l'homéostasie normale des tissus par la sécrétion de cytokines réparatrices, incluant le TGF- β 1 et IL-10, par les macrophages. Ceci affecte la production des cytokines par les neutrophiles et ces derniers sécrètent de l'IL-1ra, une cytokine anti-inflammatoire (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Le programme inflammatoire se termine finalement par la migration des macrophages vers les vaisseaux lymphatiques (Serhan *et al.*, 2005).

La reconnaissance et l'élimination des neutrophiles apoptotiques par les macrophages est un mécanisme primordial dans la résolution de la réponse inflammatoire. Ce mécanisme prévient la sécrétion incontrôlée de facteurs chimiотactiques par les neutrophiles et donc l'accumulation des leucocytes inflammatoires dans les tissus. Or, un mauvais contrôle dans ce mécanisme d'élimination entraîne une accumulation et une persistance des cellules au site inflammatoire résultant en des maladies inflammatoires chroniques. Ainsi, plusieurs stratégies thérapeutiques sont développées dans le but d'améliorer l'élimination des cellules apoptotiques et ainsi la résolution de l'inflammation chronique.

Les mécanismes de signalisation cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse inflammatoire sont de plus en plus définis. Malgré cela, on ne sait que très peu de médiateurs et de mécanismes qui concertent la résolution de celle-ci. Des données récentes révèlent que la résolution de l'inflammation est une série d'événements contrôlés par des médiateurs endogènes supprimant l'expression des gènes proinflammatoires et le trafic cellulaire, tout en induisant l'apoptose et la phagocytose des cellules inflammatoires (Lawrence *et al.*, 2002). Ces processus sont essentiels pour obtenir une résolution complète et saine pour l'hôte. Aujourd'hui, les thérapies anti-inflammatoires portent leur attention sur les moyens d'empêcher les mécanismes proinflammatoires plutôt que de mettre l'emphase sur les éléments qui stimulent les mécanismes anti-inflammatoires. Autrefois conférés à un rôle secondaire, les neutrophiles sont maintenant reconnus comme des cellules beaucoup plus dynamiques que l'on croyait. Les récentes stratégies anti-inflammatoires ciblant les neutrophiles se centrent désormais sur un processus ubiquitaire en biologie cellulaire, l'apoptose.

1.4 Les maladies inflammatoires chroniques associées aux neutrophiles

Plusieurs conditions pathologiques sont causées par l'inflammation chronique. L'athérosclérose est causée par l'inflammation chronique en réponse à l'accumulation de lipides dans la paroi artérielle. Il existe plusieurs facteurs contributifs à long terme incluant un taux anormalement élevé de glucose, l'hypertension, l'hyperlipidémie et le tabagisme. Sous l'influence de ces facteurs, les cellules tissulaires et les neutrophiles sont activées et participent à la progression de la pathogénèse (Fan *et al.*, 2014).

La plupart des pathologies associées aux neutrophiles se résultent par la présence récurrente d'infections bactériennes venant d'une défaillance dans un ou plusieurs mécanismes antibactériens spécifiques à ceux-ci. La migration, la phagocytose, la production de réactifs oxygénés ou la dégranulation des neutrophiles sont intimement reliées et sont essentielles pour une réponse inflammatoire complète et résorbée. Par exemple, une anomalie dans la structure ou le contenu normal des granules des neutrophiles empêche l'élimination complète du microorganisme suite à sa phagocytose et à sa destruction dans le phagolysosome induisant une réponse inflammatoire inefficace et inachevée. Une faible production de réactifs oxygénés peut aussi favoriser la survie des microorganismes et donc prolonge et renforce la réponse inflammatoire aiguë.

La *leukocyte adhesion deficiency*-(LAD)-1 est une défaillance autosomique et récessive affectant environ une personne sur un million. Cette maladie est le résultat d'une ou plusieurs mutations (majoritairement des mutations faux-sens et non-sens) dans la région du gène codant pour le CD18 (ou sous-unité $\beta 2$) du chromosome 21q22.3 (Weitzman *et al.*, 1991). Le CD18 est une sous-unité commune de trois intégrines (LFA-

1: lymphocyte function-associated antigen-1, Mac-1: macrophage-1 antigen et p150,95) respectivement associée avec α L β 2 / CD11a, α M β 2 / CD11b et α X. Les sous-unités α et β s'associant de façon intracellulaire avant leur exposition à la surface membranaire des cellules, c'est pourquoi une mutation dans la sous-unité β prévient l'assemblage et le transport des intégrines à la surface des cellules. Les mutations peuvent affecter la rigidité structurale de la sous-unité β et influencer les mouvements inter domaines ou la relation quaternaire avec la sous-unité α (Arnaout, 1993). La sous-unité β des intégrines joue un rôle dans l'activité régulatrice positive des intégrines et est responsable de la formation de complexes d'intégrines avec d'autres protéines membranaires (CD82 et CD63) (Hogg *et al.*, 2002). Le défaut ou l'absence des molécules d'intégrines à la surface des leucocytes diminuent grandement leur capacité d'adhérer à la surface de l'endothélium vasculaire et donc d'effectuer leur extravasation subséquente vers les sites inflammatoires (Cox *et al.*, 2008). La *leukocyte adhesion deficiency*-(LAD)-1 se manifeste concrètement par des infections bactériennes récurrentes de la bouche, de la peau et du tractus respiratoire.

Une défaillance dans la structure ou le fonctionnement de la *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxydase résulte en une maladie orpheline héréditaire ayant de graves symptômes appelée la *X-chronic granulomatous disease* (X-CGD). Cette maladie est, le plus souvent des cas, reliée au chromosome X et est caractérisée par une déficience structurelle ou catalytique des sous-unités gp91phox ou p47phox, p22phox et p67phox de la NADPH oxydase. Les mutations les plus fréquentes (récessives liées à l'X) touchant notamment Nox2 (gp91phox) ont pu aider à la compréhension de l'assemblage et de l'activation de la NADPH oxydase. Cette maladie survient généralement dès le plus jeune âge et est caractérisée par la présence

d'infections bactériennes ou fongiques persistantes résultant de l'incapacité des phagocytes à produire des réactifs oxygénés (Stasia *et al.*, 2008).

1.5 Les modèles inflammatoires

Les modèles inflammatoires d'animaux sont essentiels pour étudier les bases physiologiques fondamentales de l'inflammation. La réponse inflammatoire *in vivo* implique la concertation de plusieurs types cellulaires différents. Il existe principalement deux types de modèles inflammatoires *in vivo*, les modèles d'inflammation aiguës et chroniques.

Il est possible de simuler une réponse inflammatoire aiguë chez les rats ou les souris de plusieurs façons. En injectant dans la patte de l'animal des produits comme la carragénine (Winter *et al.*, 1962) ou l'histamine (Amann *et al.*, 1995), ou bien dans l'œil des substances comme de l'oxazolone (D. P. Evans *et al.*, 1971), le PMA (Griswold *et al.*, 1998) ou l'acide arachidonique (Romay *et al.*, 1998), il est possible de recréer ce type d'inflammation. Aussi, il est possible de créer une cavité propice au développement d'une réponse inflammatoire en induisant une poche d'air sous-cutané. L'agent inflammatoire peut être de la carragénine (Selye, 1953) ou des cristaux d'urate (Ryckman *et al.*, 2003).

Il est aussi possible de stimuler une réponse inflammatoire chronique par l'instillation intratrachéale de bactéries comme *Haemophilus influenzae*, *Moraxella Catarrhalis* (gram-négatives) ou *Streptococcus Pneumoniae* (gram-positive). La persistance de l'infection induit une réponse inflammatoire chronique dans les voies respiratoires mimant une bronchite chronique (Lugade *et al.*, 2011). Ce modèle est utilisé pour étudier

la pathogénèse de la broncho-pneumopathie chronique obstructive (COPD), une maladie dont le taux de mortalité augmente annuellement aux États-Unis. Les muqueuses respiratoires sont exposées à l'environnement extérieur à chaque respiration et donc sont le siège d'une défense immunitaire robuste et sophistiquée. L'asthme et la fibrose kystique sont deux autres maladies respiratoires dont la pathogénèse est due à l'hypersensibilité bronchique causant l'infiltration des cellules immunitaires et l'obstruction des voies respiratoires (Soltzberg *et al.*, 2011). Pour évaluer les effets des médicaments potentiels, des lavages broncho-alvéolaires sont effectués. À partir des exsudats ainsi récoltés, la présence des cellules immunitaires comme les macrophages et les neutrophiles, des cytokines inflammatoires et des chimiokines est mesuré comme marqueurs de l'inflammation (souvent associé à la gravité de la pathologie).

Il est aussi possible d'aller évaluer directement la présence des macrophages alvéolaires et des neutrophiles à l'aide de la microscopie à fluorescence. Par exemple, l'utilisation du poisson zèbre comme modèle permet de visualiser la réponse inflammatoire en temps réel grâce à clarté optique des embryons (Mathias *et al.*, 2007). Effectivement, des avancées récentes ont permis de créer des poissons zèbres transgéniques chez lesquelles des lignées cellulaires spécifiques incluant les lymphocytes, les macrophages et les neutrophiles (Mathias *et al.*, 2006) sont marquées par une protéine fluorescente comme la GFP (green fluorescent protein).

2. Les neutrophiles

La présence des neutrophiles dans les tissus est un des marqueurs les plus probants de l'inflammation. Les neutrophiles sont les cellules immunitaires les plus abondantes et possèdent une physiologie particulière et unique. La prochaine section présente un aperçu de la physiologie des neutrophiles, à travers leur développement, leur physiologie, leurs fonctions et leur régulation.

2.1 Développement et maturation des neutrophiles

Le développement et la maturation des neutrophiles sont des processus bien définis qui s'effectuent dans la moelle osseuse (Bainton *et al.*, 1971). Le développement et la maturation des neutrophiles se produisent sur une période d'environ 14 jours dans la moelle osseuse (voir figure 2). Ils sont originaires d'une cellule souche pluripotente hématopoïétique se transformant en myéloblaste (MB), un type cellulaire servant de réserve et suivi de deux types cellulaires : les promyélocytes (PM) et les myélocytes (MC). À ces stades, les cellules sont toujours dans une phase mitotique et on voit l'apparition d'un type de granule à chaque stade. Les granules azurophiles n'apparaissent qu'au stade promyélocyte (Bainton *et al.*, 1968) et les granules spécifiques (secondaires ou sécrétaires) seulement durant le stade myélocyte. Après avoir passé les 7 derniers jours à se diviser, les cellules se transforment en métamyélocytes (MM), puis en neutrophiles segmentés (NS). À ces stades, les cellules sont encore immatures dans leur développement mais elles ont terminé la phase mitotique des stades précédents. Au stade métamyélocyte le changement de forme du noyau commence à se produire jusqu'à l'obtention de noyaux segmentés. Ce processus continuant, les métamyélocytes s'appellent désormais les neutrophiles segmentés. Suite

à 14 jours de maturation dans la moelle osseuse, les neutrophiles matures (NM) sont maintenant polymorphonucléés et possèdent tous leurs granules, on les appelle donc des neutrophiles polymorphonucléaires (Bainton *et al.*, 1971).

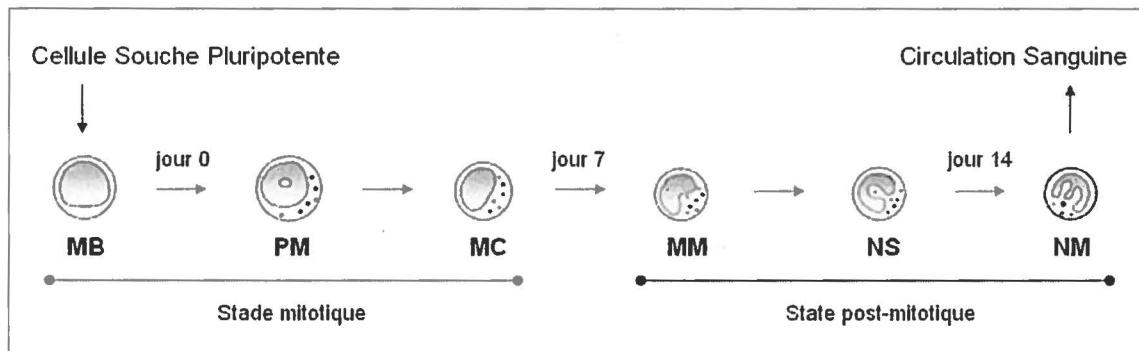


Figure 2: Développement et maturation des neutrophiles. Les neutrophiles se développent à partir d'une cellule souche pluripotente de la moelle osseuse. Après 14 jours de développement dans la moelle osseuse, les neutrophiles quittent pour la circulation sanguine et vont n'y perdurer que quelques jours. MB: myelobaste, PM: promyélocyte, MC: myélocyte, MM: metamyélocyte, NS: neutrophile segmenté, NM: neutrophile mature.

La famille de cytokines appelée «*colony-stimulating factor*» (CSF) joue un rôle central dans le développement et la prolifération cellulaire des leucocytes, en plus de moduler leurs fonctions. Elle regroupe principalement les glycoprotéines *macrophage-CSF* (M-CSF), *granulocyte-CSF* (G-CSF), *granulocyte/macrophage-CSF* (GM-CSF) et *multi-CSF* (IL-3). M-CSF et G-CSF sont spécifiques à la lignée myéloïde ayant un rôle dans la prolifération, la différenciation et la survie des macrophages, des neutrophiles et de leurs précurseurs (Page *et al.*, 2011). Les GM-CSF et IL-3 jouent plutôt un rôle aux étapes précoces de développement des leucocytes dans l'expansion et la maturation des précurseurs hématopoïétiques. Les CSF sont solubles et peuvent transmettre leurs signaux de façon paracrine, endocrine ou autocrine (Broughton *et al.*, 2012).

Le récepteur au GM-CSF (GM-CSFR, aussi connu sous le nom de CD116) est présent sur les neutrophiles matures et les myéloblastes. Le récepteur est un hétérodimère consistant en l'assemblage d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité bêta, celle-ci est aussi présente dans les récepteurs pour IL-3 et IL-5. La sous-unité alpha contient le domaine de liaison avec le GM-CSF alors que la sous-unité bêta contient le domaine de transduction du signal (van de Laar *et al.*, 2012). L'association des deux sous-unités mène à l'activation du signal. L'activation par le GM-CSF mène à la phosphorylation de la sous-unité bêta sur les résidus tyrosines par la kinase membre de la famille *Janus* (JAK), JAK2. La phosphorylation des résidus tyrosines par JAK2 permet l'activation des domaines de types SH2 qui permet le recrutement d'une protéine adaptatrice résultant en l'activation des voies signalétiques en aval. Les voies signalétiques du récepteur de GM-CSF sont complexes et variées et incluent les modules signalétiques PI3K/PKB/FOXO, JAK2/STAT5, RAF/MEK/ERK et IKK/I_Kb/NF-_kB chez les cellules dendritiques (van de Laar *et al.*, 2012).

Le G-CSF est une cytokine essentielle à la prolifération et à la différentiation des granulocytes à partir des cellules souches hématopoïétiques. Chez les mammifères, le G-CSF est un facteur clé qui promeut la migration des neutrophiles de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. Le G-CSF recombinant est utilisé pour stimuler la production des neutrophiles et pour accélérer le rétablissement des neutropénies associées aux chimiothérapies. Il est aussi utilisé en essai clinique chez les nouveau-nés prématurés pour contrer les neutropénies et les septicémies (Chaudhuri *et al.*, 2012).

2.2 La neutropénie

Une neutropénie est une réduction dans le nombre absolu de neutrophiles présents dans la circulation. La présence d'une sévère neutropénie occasionnée par des infections reflète l'importance des neutrophiles. Il existe plusieurs formes de neutropénie (aiguë, sévère, congénitale, cyclique, idiopathique, humorale, provoquée par des médicaments) (Boxer, 2012). La neutropénie congénitale sévère est caractérisée par un compte de neutrophiles continuellement faible (< 500 cellules/ μ l de sang) et a été identifiée pour la première fois dans une petite communauté isolée de la Suède en 1956 (Kostmann, 1956). Le syndrome de Kostmann est associé à de sévères et récurrentes infections, se développant souvent dans les premiers mois après la naissance (Dale *et al.*, 2011). Un examen de la moelle osseuse permet de voir la présence d'un blocage dans la maturation myéloïde au stade promyélocyte-myélocyte du développement cellulaire des neutrophiles. Les patients laissés sans traitement souffrent de gingivites chroniques, d'ulcères oraux, d'abcès épidermiques, de pneumonies récurrentes et même de septicémies (Boxer, 2012). Les neutropénies sont le plus souvent le résultat d'un arrêt dans la maturation myéloïde ou bien de défaillances génétiques pouvant affecter les structures membranaires, les vésicules sécrétoires, le métabolisme mitochondrial, la biogénèse des ribosomes, la régulation transcriptionnelle ou la dynamique des protéines du cytosquelette (Boxer, 2012).

2.3 La physiologie des neutrophiles

Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires qui migrent sur le site inflammatoire. Ils sont les grands responsables de la réponse inflammatoire. Suite à une blessure, une infection, une brûlure chimique, un cancer, les neutrophiles quittent la

circulation sanguine par un processus appelé extravasation, et migrent en direction de l'épicentre du stimulus en suivant le gradient de concentration des médiateurs de l'inflammation. Cette migration est appelée chimiotaxie et est initiée par des médiateurs chimiques et des molécules telles que l'interleukine-8 (IL-8), le fragment C5a du complément, les peptides microbiens (fMLP) et le leucotriène β_4 (LTB₄) (Kindt *et al.*, 2007). Une fois sur les lieux, les neutrophiles exercent leur activité antimicrobienne et sécrètent des cytokines et des médiateurs chimiques pour amplifier la réponse inflammatoire et attirer une seconde vague de cellules immunitaires sur les lieux créant ainsi un pont entre l'immunité innée et l'immunité acquise.

Les neutrophiles ont une durée de vie très courte relativement aux autres cellules du système immunitaire car ils entrent spontanément en apoptose en conditions physiologiques normales (Borregaard, 2010). Par contre, en cas d'infections ou de blessures, ils sont les premiers répondants à migrer au site inflammatoire, une conséquence directe de leur grand nombre et de leur mobilité accrue. Les neutrophiles possèdent un grand pouvoir microbicide et inflammatoire. La contribution de ceux-ci à l'immunité est primordiale, car un manquement dans leur durée de vie ou dans leur activation peut générer de graves complications de santé.

2.3.1 La production des réactifs oxygénés

Produits à partir des compartiments membranaires des phagolysosomes, les réactifs oxygénés (ROS) constituent un élément majeur de la réponse inflammatoire. S'ils ne sont pas bien régulés, les ROS sont capables de générer des dommages à l'hôte. L'inflammation chronique causée par la présence persistante de ROS peut mener à des maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde et l'athérosclérose (Hopkins,

2013, Mirshafiey *et al.*, 2008) Les neutrophiles possèdent de puissantes enzymes capables de générer de grandes quantités de molécules réactives (O_2^- , H_2O_2 , HOCl $^-$) et la plupart sont issues de l'activité de la NADPH oxydase. Les ROS sont impliqués dans la destruction du pathogène lors de la formation du phagolysosome. Lorsqu'elle est activée la NADPH oxydase produit une énorme quantité d'anions superoxydes (O_2^-) convertis en dérivés toxiques de l'oxygène, dont notamment l'acide hypochloreux (HOCl). Le HOCl est synthétisé par la myéloperoxydase (MPO) à partir du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) provenant de la dismutation des O_2^- . L'action conjointe des dérivés de l'oxygène et des enzymes lytiques conduit à la dégradation du pathogène (Roos *et al.*, 2002).

Son importance capitale est révélée par une anomalie génétique héréditaire appelée granulomatose chronique. Cette affection du système immunitaire a été utilisée comme modèle d'étude et nous a permis de découvrir énormément de données concernant la NADPH oxydase (Stasia *et al.*, 2008). Les patients souffrant de granulomatose chronique souffrent d'infections récurrentes, à cause de l'incapacité des neutrophiles à balayer la présence des microorganismes et nécessitent un suivi constant de la part d'une expertise médicale aguerrie (Holland, 2013).

Les ROS sont essentiels, mais en même temps leur puissance de frappe est un couteau à double tranchant pour l'hôte et contribue au développement de pathologies inflammatoires et autoimmunitaires. Une étude a pu démontrer que, comparés aux sujets sains, les neutrophiles et les monocytes provenant de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde produisent plus de superoxydes (Miesel *et al.*, 1996).

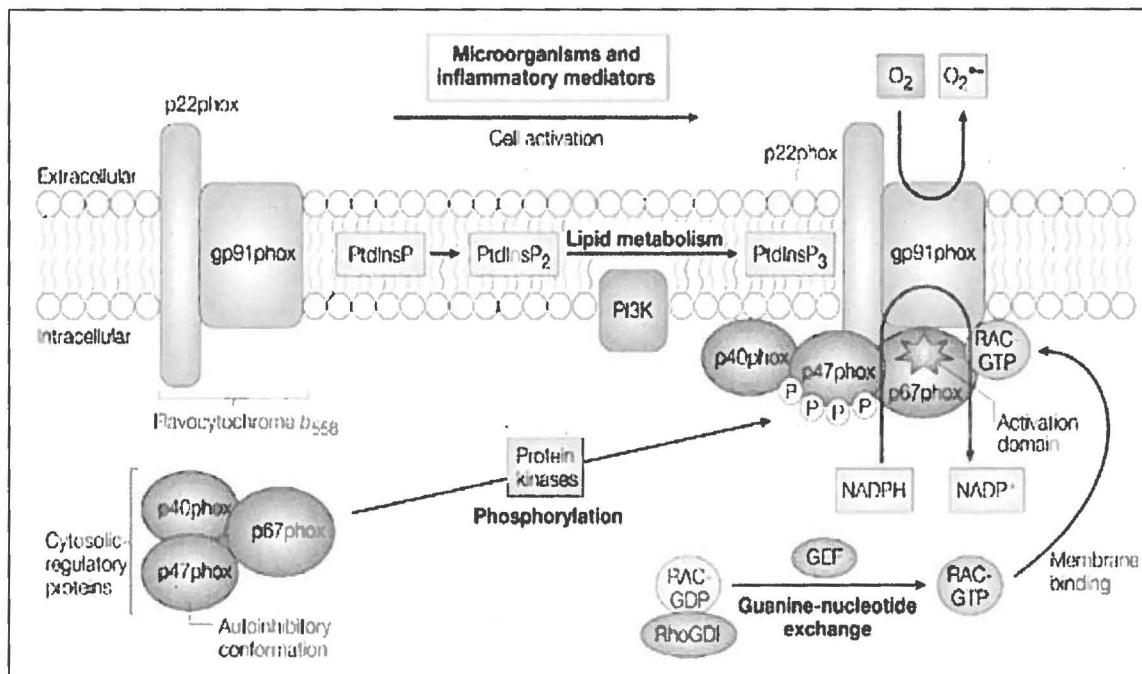


Figure 3: Structure et activation de Nox2 NADPH oxydase. L'activation du système gp91phox se produit par au moins trois mécanismes signalétiques et résulte en l'assemblage des sous-unités cytosoliques régulatrices (p40phox, p47phox et p67phox) avec le flavocytochrome b558 (gp91phox et p22phox). L'activation de la GTPase RAC permet à la sous-unité p47phox de se dissocier de son complexe autoinhibiteur et de venir s'associer avec la sous-unité p22phox. L'assemblage de la structure quaternaire de la NADPH oxydase permet l'activation du complexe catalytique et la production de superoxydes. Source: (Lambeth, 2004).

Or, il a été montré que cette production peut être diminuée par l'ajout de prednisolone (inhibiteur de la NADPH oxydase), lui suggérant ainsi un rôle majeur dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde (Miesel *et al.*, 1996). Une autre étude a montré que l'activation excessive de la NADPH oxydase des neutrophiles semble être responsable de la production des superoxydes initiant les lésions vasculaires durant la pathogénèse de l'athérosclérose (Kinkade *et al.*, 2013). Effectivement, ces données nous indiquent un rôle majeur de la NADPH oxydase dans l'initiation et le développement des maladies inflammatoires chroniques.

Les neutrophiles possèdent aussi d'autres enzymes capables de générer des molécules réactives dont la myéloperoxydase (MPO). Cette enzyme est responsable de la formation d'acide hypochlorique (HOCl) et semble jouer un rôle dans la défense contre les moisissures (Aratani *et al.*, 2012). Aratani et ses collègues ont aussi montré en utilisant un modèle de souris knock-out (K.O.) pour la myéloperoxydase que ces souris exhibaient une inflammation pulmonaire plus sévère suite à l'instillation de zymosan. Ils ont associé l'absence de MPO à la sécrétion de MIP-2, menant au recrutement des neutrophiles et des macrophages dans les poumons. La régulation de MPO est donc importante dans l'accumulation leucocytaire durant l'inflammation pulmonaire (Aratani *et al.*, 2012). La MPO est particulièrement utile d'un point de vue histologique car sa localisation est strictement réduite aux granules azurophiles des neutrophiles. On peut donc s'en servir comme marqueur spécifique de l'inflammation car sa présence indique une infiltration des neutrophiles dans les tissus (Bainton *et al.*, 1971).

2.3.2 La sécrétion des cytokines et des chimiokines

La sécrétion des cytokines et des chimiokines est un fait marquant de l'inflammation. La présence de certaines cytokines est reliée à plusieurs maladies inflammatoires et autoimmunes. Les cytokines et les chimiokines sont de puissants médiateurs de l'inflammation régulant le trafic cellulaire dans les différents tissus de l'organisme (Sanz *et al.*, 2012). Conventionnellement, le paradigme du roulement et de l'adhésion des neutrophiles à la paroi de l'endothélium vasculaire est un phénomène qui s'effectue en réponse aux cytokines et chimiokines. Elles stimulent l'attachement, la reptation intraluminale et la migration transendothéliale des neutrophiles. La migration des neutrophiles vers le site inflammatoire est un processus complexe nécessitant la concertation de plusieurs molécules d'adhésion et de dégradation de la matrice

extracellulaire. Les cytokines et les chimiokines sont de puissants médiateurs de l'inflammation produits par plusieurs types de cellules en réponse aux infections et autres stimuli proinflammatoires (Baggiolini, 2001).

Bien qu'ils ne soient pas de grands producteurs de cytokines comme les macrophages, les lymphocytes T ou les cellules tueuses naturelles (*Natural Killers, NK*), les neutrophiles ont la capacité de sécréter différentes cytokines suivant leur activation (Cassatella, 1995). La production des cytokines et des chimiokines par les neutrophiles est grandement influencée par des agents stimulants comme le LPS (lipopolysaccharide), le zymosan ou d'autres cytokines. Le tableau suivant présente les différentes cytokines exprimées par les neutrophiles (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

Tableau I : Classement des cytokines sécrétées par les neutrophiles.

Cytokines pro-inflammatoires	Cytokines anti-inflammatoires	Chimiokines	Facteurs de croissances	Sécrétées sous certaines conditions	Sécrétion mitigée
TNF- α	IL-1ra	IL-8	INF- α	M-CSF	IL-6
IL-1 α		GRO- α	INF- β	IL-3	MCP-1
IL-1 β		MIP-1 α	G-CSF	GRO- β	GM-CSF
IL-12		MIP-1 β	FasLigand	IL-18	SCF
		CINC	CD30Ligand	TGF- α	INF- γ
			VEGF	oncostatine	
			HGF	neurotrophines	

Abréviations: TNF: tumor necrosis factor, IL-1ra: IL-1 receptor antagonist, GRO: growth related gene product, MIP: macrophage infiltrating protein, CINC: cytokine induced chemoattractant, INF: Interferons, G-CSF: granulocyte-colony-stimulating factor, VEGF: vascular endothelial growth factor, HGF: hepatocyte growth factor, M-CSF: macrophage-colony-stimulating factor, MCP-1: monocyte chemotactic protein-1, SCF: stem cell factor. Source: (Cassatella, 1995).

Les cytokines et les chimiokines sont de petits peptides capables de moduler la réponse inflammatoire. Elles forment une famille de protéines caractérisée par la présence conservée de 4 résidus cystéines (C) formant des ponts disulfures et sont classées en 4

familles (CXC, CC, C et CX₃C) (Baggiolini, 2001). Les cytokines et les chimiokines transmettent leur signal via leur interaction avec un récepteur couplé à une protéine G (G-protein-coupled-receptor, GPCR) (Johnson *et al.*, 2005). Leur sécrétion par les cellules résidentes et tissulaires est à l'origine du recrutement leucocytaire dans les tissus suite à un stimulus inflammatoire.

2.3.3 La migration des neutrophiles au site inflammatoire

L'infiltration des neutrophiles dans les tissus est un marqueur incontournable de l'inflammation. La figure 4 montre un schéma de l'extravasation des neutrophiles à travers la paroi endothéliale. Suite à l'engagement des récepteurs couplés aux protéines G, une signalisation cellulaire de type «inside-out» déclenche l'activation des intégrines (Luo *et al.*, 2007). L'activation des intégrines mène à leur attachement avec leurs ligands naturels, incluant la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) (pour les β2-intégrines) et la molécule d'adhésion vasculaire-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) (pour les α4-intégrines), résultant à l'arrêt des neutrophiles le long de la paroi de l'endothélium vasculaire (Evans *et al.*, 2009). Les intégrines ne sont pas seulement responsables de l'attachement des neutrophiles à l'endothélium vasculaire, elles peuvent aussi transférer des signaux de type «outside-in» aux cellules (Ginsberg *et al.*, 2005). Ces signaux permettent d'induire la reptation leucocytaire et l'extension des pseudopodes durant la migration transendothéliale (Giagulli *et al.*, 2006, Ley *et al.*, 2007).

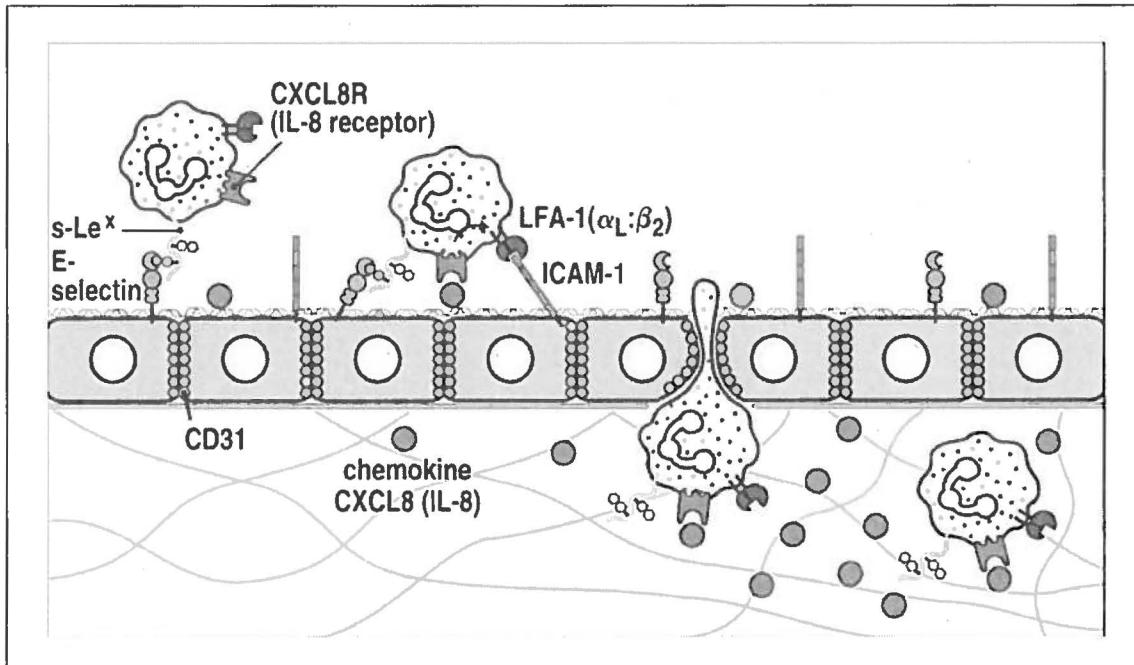


Figure 4 : Extravasation des neutrophiles. L'expression de cytokines (IL-8) par les cellules endothéliales entraîne le roulement et l'attachement des neutrophiles à la paroi endothélique. Suite à l'implication des intégrines (LFA-1), les neutrophiles traversent la paroi par un procédé appelé extravasation. Une fois la barrière franchie, les neutrophiles se dirigent dans la direction du gradient de concentration des médiateurs inflammatoires. (Janeway *et al.*, 2009).

Une fois la barrière vasculaire franchie, les neutrophiles se dirigent à l'intérieur du tissu en suivant le gradient de concentration des molécules chimiotactiques. Ce processus requiert le clivage protéolytique des composants de la matrice extracellulaire. Les constituants moléculaires nécessaires à la migration des neutrophiles sont regroupés dans les granules et sont mobilisés durant le mouvement des cellules. Une déficience durant la granulopoïèse des neutrophiles peut mener à plusieurs complications immunitaires incluant la granulomatose chronique, des déficiences d'adhésion leucocytaire (leukocyte adhesion deficiencies, LAD) et des granules spécifiques (specific granule deficiency, SGD) (Hager *et al.*, 2010). Pour atteindre le site inflammatoire les neutrophiles utilisent des enzymes comme les gélatinases et les élastases. Outre les

enzymes et les peptides antimicrobiens, l'imposante machinerie protéique impliquée dans la production des réactifs oxygénés et dans la phagocytose se retrouvent dans les granules qui peuvent être rapidement mobilisés à la surface membranaires des neutrophiles par un processus appelé dégranulation (Simard *et al.*, 2010).

2.3.4 Les granules des neutrophiles

Les neutrophiles possèdent quatre types de granules qui diffèrent en forme et en contenu. On peut identifier les différents types de granules par le marquage de protéines spécifiques. Les granules azurophiles contiennent de grande quantité d'enzymes lysosomales (Faurschou *et al.*, 2003) et sont caractérisés par la présence de la granulophysine (CD63) dans leur membrane (Cham *et al.*, 1994). Les granules gélatinases sont plus rapidement mobilisés que les autres types de granules et représentent le principal réservoir d'enzymes de dégradation comme par exemple les métalloprotéases (Kjeldsen *et al.*, 1992). Les granules spécifiques sont riches en peptides antimicrobiens et participent aux activités microbicides des neutrophiles (Mollinedo *et al.*, 1997, Sengelov *et al.*, 1995). Finalement, les vésicules sécrétaires sont prétendument formées par endocytose (N. Borregaard *et al.*, 1987) et seraient le réservoir principal de nombreux récepteurs membranaires essentiels à la réponse inflammatoire des neutrophiles (Sengelov *et al.*, 1993a, Sengelov *et al.*, 1994).

Tableau II : Composition des granules des neutrophiles (membrane et matrice).

Primaires gr. Azurophiles	Secondaires gr. Spécifiques	Tertiaires gr. Gélatinases	Quaternaires gr. Sécrétrices
cathepsine G	lactoferrine	gélatinase	cytochrome b ₅₅₈
élastase	cathelicidine	acétyltransferase	albumine
protéinase-3	collagénase	β ₂ -microglobuline	immunoglobuline
CAP-37	gélatinase	lysozyme	transferrine
CAP-57	histaminase	cytochrome b ₅₅₈	protéinase-3
défensines	héparinase	CD11b/CD18	CR1
MPO	Sialidase	CD66b	CD11b/CD18
muramidase	hCAP-18 (LL-37)		alkaline phosphatase
lysozyme	β ₂ -microglobuline		CD10
α ₁ -antitrypsine			CD13
CD63			CD14
			C1q-R
			fMLP-R
			leukolysine

Abréviations: CAP: cationic antimicrobial protein, MPO: myéloperoxydase, CD: Cluster of differentiation, CR1; complement receptor 1, fMLP-R: formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine – receptor. Source: (Faurschou *et al.*, 2003).

Tous les types de granules, à l'exception des granules azurophiles, sont rapidement mobilisés à la surface membranaire des neutrophiles suite à leur exposition aux molécules proinflammatoires. La dégranulation des neutrophiles se produit via l'activation des récepteurs en réponse aux chimiokines (IL-8), aux peptides bactériens (fMLP) et aux cytokines (TNF-α) (Binet *et al.*, 2008, Faurschou *et al.*, 2002, Sengelov *et al.*, 1993a, Sengelov *et al.*, 1993b). Les granules azurophiles forment un constituant majeur du phagolysosome et participent activement à l'activité microbicide durant le processus de phagocytose des neutrophiles (Klebanoff *et al.*, 2013).

2.3.5 La phagocytose des neutrophiles

La phagocytose est un processus majeur de destruction des microbes. C'est un processus dans lequel la reconnaissance d'une particule par des récepteurs spécifiques à la surface des phagocytes déclenche la polymérisation de l'actine, l'internalisation de la particule et sa livraison dans des organelles intracellulaires spécialisés contenant des enzymes et des produits antimicrobiens. L'internalisation d'une particule via un récepteur résulte en la formation d'une vésicule appelée phagosome. Le phagosome fusionne avec les granules primaires et secondaires et finalement avec les lysosomes pour former une vésicule pleinement destructive appelée phagolysosome. Cette dernière contient des peptides antimicrobiens, des enzymes digestives (élastase, Cathepsin G), et des réactifs de l'oxygène et de l'azote hautement toxiques (DeFranco *et al.*, 2007). Un processus similaire se produit pour les macrophages et les cellules dendritiques à l'exception des granules primaires et secondaires qui sont absentes chez ces derniers.

Les phagocytes possèdent une multitude de récepteurs de phagocytose. Quelques-uns de ces récepteurs sont décrits dans le tableau III. La nature exacte du processus de phagocytose dépend du récepteur engagé par la particule. Tous les récepteurs de phagocytose activent la polymérisation de l'actine via des petites GTPases appartenant à la famille des Rho-GTPases. Lorsque la phagocytose est déclenchée par le récepteur du complément 3 (CR3), l'internalisation de la particule s'effectue de façon lente et douce. Ce processus est dépendant des petites Rho-GTPases, dans ce cas-ci la fusion avec le lysosome se fait lentement, mais peut être accélérée par la reconnaissance d'autres récepteurs, comme le TLR et le C-Type lectine récepteur (DeFranco *et al.*, 2007). Aussi, les activités antimicrobiennes peuvent être exacerbées par la

reconnaissance simultanée de iC3b (fragment du complément) et de β -glucane (composant de la paroi des bactéries). Lorsque la phagocytose implique un récepteur de type Fc γ , les particules sont opsonisées par des anticorps. Ce processus de phagocytose est plus vigoureux et les membranes forment des extensions qui englobent la particule. Ces extensions membranaires sont formées à la suite d'une polymérisation de l'actine contrôlée par deux autres GTPases, Rac et Cdc42 (Forsberg *et al.*, 2003). Cette phagocytose plus vigoureuse par les récepteurs Fc γ peut s'expliquer par le fait que le complément peut opsoniser des pathogènes et/ou des cellules apoptotiques, alors que les anticorps sont spécifiques pour les pathogènes (DeFranco *et al.*, 2007).

La phagocytose est l'arme blanche des neutrophiles car ce procédé requiert un contact direct avec les microorganismes. La phagocytose des neutrophiles est facilitée par l'opsonisation des bactéries par les immunoglobulines (Ig) (Nimmerjahn *et al.*, 2008) ou par les constituants du complément (Brown, 1992). La phagocytose est un processus dynamique qui requiert la réorganisation du cytosquelette d'actine (May *et al.*, 2001) et la transmission de signaux issus des récepteurs au niveau de la membrane plasmique (Garcia-Garcia *et al.*, 2002). La reconnaissance des pathogènes par les neutrophiles, ainsi que leur phagocytose subséquente, engendre la production de réactifs oxygénés (Turrens, 2003). Une fois ingéré à l'intérieur des cellules, le phagosome fusionne avec des granules (notamment les granules azurophiles) pour former des compartiments spécialisés hautement cytotoxiques. L'activité antimicrobienne des phagolysosomes est reliée aux toxines *de novo* synthétisées par la NADPH oxydase et la MPO (Klebanoff *et al.*, 2013).

Tableau III : Les récepteurs de phagocytose dans l'immunité innée.

Récepteurs	types	expression	ligands
Récepteurs de l'immunité innée			
Mannose	C-type lectin	MΦ, DC	Mannoses
DEC-205	C-type lectin	DC	Mannoses
Dectin-1	C-type lectin	MΦ	Polysaccharides riches en glucoses
CD14	Motifs riches en Leu	MΦ, PMN	Cellules apoptotiques, LPS
MARCO	SR-A	MΦ	Parois bactériennes
Scavenger reporter A I	SR-A	MΦ	Cel. apoptotiques, LPS, LTA
CD36	SR-B	MΦ	Cel. apoptotiques, érythrocytes parasités
Récepteurs d'opsonines			
C1qRp (CD93)	C-type lectin	MΦ	C1q, collectines
CR3 (CD11c/CD18)	Intégrine	MΦ, PMN	iC3b, β-glucanes, ICAM1/2
CR4 (CD11d/CD18)	Intégrine	MΦ, PMN, DC	iC3b, fibrinogène
FcγRI (CD64)	Ig, ITAM	MΦ, PMN	IgG, CRP, SAP
FcγRII (CD32)	Ig, ITAM	MΦ, PMN	IgG
FcγRIII (CD16)	Ig, ITAM	MΦ, PMN, NK	IgG, SAP
FcγRIV	Ig, ITAM	MΦ, PMN, DC	IgG2a, IgG2b
FcαR (CD89)	Ig, ITAM	MΦ, PMN, Éos	IgA
Intégrine αVβ3	Intégrine	MΦ, plaquettes	Cel. opsonisées à la thrombospondine
Mer	RTK	MΦ	Cel. apoptotiques

Abréviations : MΦ : macrophages, DC : cellules dendritiques, PMN : neutrophiles, Éos : éosinophiles, NK : cellules tueuses naturelles, LPS : Lipopolysaccharide, ICAM : «Inter Cellular Adhesion Molecule», ITAM : «Immunoreceptor tyrosine-based activation motif», Ig : Immunoglobuline. (DeFranco A., 2007)

2.4 L'apoptose des neutrophiles

L'apoptose des neutrophiles est essentielle afin d'éviter que l'inflammation ne deviennent excessive. Une défaillance dans le programme de mort cellulaire des neutrophiles est à l'origine de plusieurs maladies. Le taux de renouvellement quotidien des neutrophiles (autour de 10^9 cellules/kg de poids corporel) est un chiffre démesurément élevé. La régulation de ce taux de renouvellement est donc un procédé contrôlé de manière stricte (Summers *et al.*, 2010). La théorie acceptée est que les

neutrophiles survivent en moyenne 8 heures après avoir quitté la moelle osseuse pour la circulation sanguine (Borregaard, 2010).

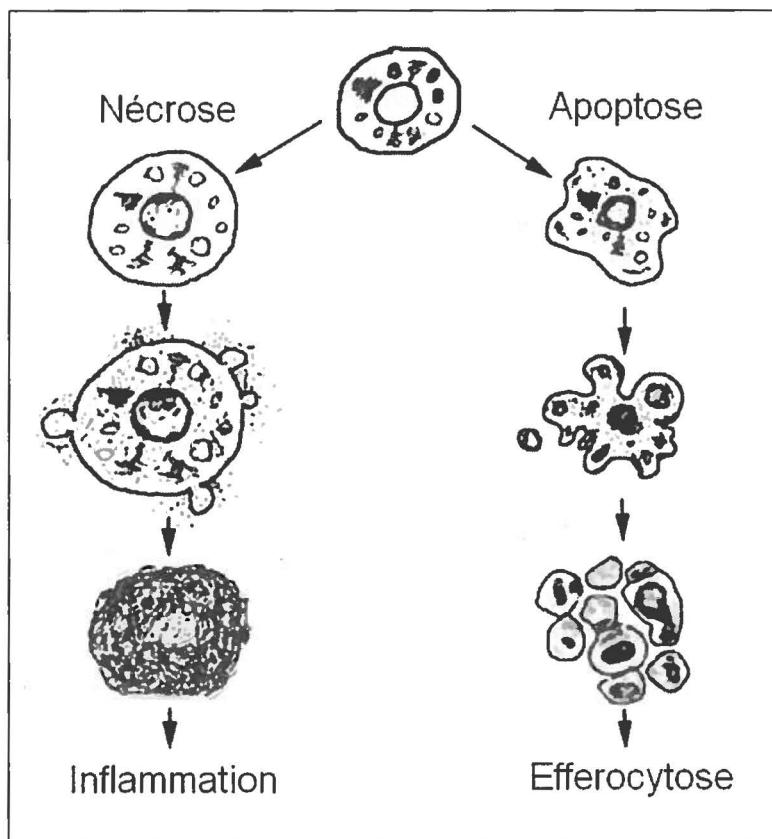


Figure 5 : Importance de l'apoptose et de la nécrose en inflammation. L'apoptose est caractérisée par la condensation de la chromatine, la marginalisation de la périphérie nucléaire et la diminution du volume cellulaire et résulte en la formation de corps apoptotiques isolés par une membrane et dont la phagocytose n'induit pas de réponse inflammatoire. La nécrose est caractérisée par la disruption de l'intégrité membranaire et la libération du contenu cytosolique dans le milieu extracellulaire induisant une réponse inflammatoire. Source : modifié de (Van Cruchten et al., 2002).

Toutefois, une expérience réalisée par Pillay et al. en 2010 a permis de démontrer que la demi-vie des neutrophiles serait de plus ou moins 90 heures en utilisant un procédé de marquage *in vivo* à l'aide de molécule d'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$) plutôt que la méthode

classique du marquage *ex vivo* (qui a tendance à sous-estimer la durée de vie des neutrophiles) (Pillay *et al.*, 2010). Néanmoins, une telle extension dans la durée de vie des neutrophiles en conditions homéostatiques est encore *desideratum*. Nonobstant cela, cette nouvelle vision de la durée de vie des neutrophiles ouvre la fenêtre vers la création de nouveaux schémas définissant le rôle des neutrophiles dans l'homéostasie immunitaire.

Un mécanisme très important relié à ce phénomène est la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages appelé efférocytose (Fullerton *et al.*, 2013). Elle permet l'élimination des neutrophiles apoptotiques et ce processus est une étape critique dans le processus de cicatrisation du tissu et la résolution de l'inflammation (Caruso *et al.*, 2012). Il est même suggéré que les neutrophiles fassent preuve de cannibalisme et exerçaient eux-mêmes ce processus. L'apoptose des neutrophiles et leur efférocytose est un point central d'une résolution complète de l'inflammation et elle fait l'objet d'intense recherche axées sur le traitement des maladies inflammatoires causées par les neutrophiles (Serhan *et al.*, 2007).

Les neutrophiles sont les soldats du système immunitaire et sont reconnus comme des cellules possédant des propriétés anti-infectieuses et proinflammatoires de par les puissantes molécules qu'ils synthétisent et leur capacité de phagocytose (Borregaard, 2010). Conséquemment, leurs activités biologiques doivent être régulées de façon stricte pour éviter les débordements lors d'une réponse inflammatoire. L'induction de l'apoptose est une manière efficace pour résoudre l'inflammation excessive. Il est bien connu que les neutrophiles possèdent une durée de vie courte et ne prolifèrent pas, par contre les mécanismes exacts de la mort cellulaire des neutrophiles sont contexte-dépendants et peuvent inclure l'apoptose, la nécrose, la pyroptose (inflammasome), la

NETose (neutrophil extracellular trap, NET), l'apoptose induite par la phagocytose (phagocytosis-induced cell death, PCID) (Kennedy *et al.*, 2009) et l'autophagie (Mitroulis *et al.*, 2010). Le choix final de la mort cellulaire dépendra du contexte présenté et sera déterminé par la combinaison des facteurs présents *in situ*.

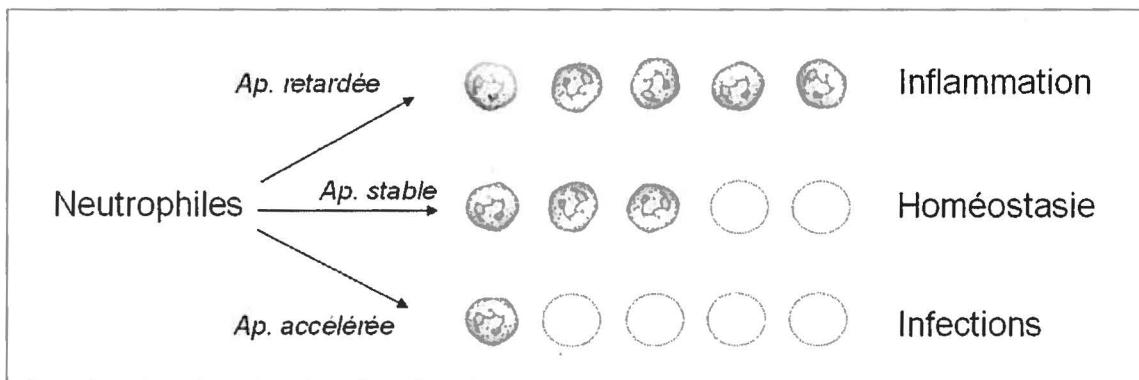


Figure 6 : Importance du taux d'apoptose des neutrophiles. Un taux d'apoptose retardé induit la survie des neutrophiles et entraîne une réponse inflammatoire prolongée pouvant résulter en l'inflammation chronique. Un taux d'apoptose accéléré induit la diminution de la survie des neutrophiles et entraîne des infections subséquentes à la vulnérabilité du système immunitaire. Un taux d'apoptose stable résulte en une saine homéostasie inflammatoire. Légende : Ap. : Apoptose.

L'apoptose des neutrophiles est essentielle au maintien de l'homéostasie. Certains mécanismes d'apoptose sont spécifiques aux neutrophiles et permettent de contrôler leur survie et leur activation. L'apoptose des neutrophiles peut être modulée par plusieurs agents endogènes ou exogènes. Le microenvironnement (cytokines, chimiokines, protéines de phases aiguës, cellules immunitaires présentes, etc.) du site inflammatoire déterminera le mécanisme par lequel les neutrophiles entreront, ou pas, en apoptose pour effectuer la résolution de l'inflammation. Une apoptose accélérée entraîne un manque de cellules et augmente la susceptibilité aux infections, alors qu'une apoptose retardée entraîne un surplus de cellules et augmente la réponse inflammatoire.

de ces dernières. Une apoptose stable permet de conserver une saine homéostasie inflammatoire.

2.4.1 La voie intrinsèque

L'apoptose des neutrophiles se distingue par plusieurs éléments. D'abord, la proéminence de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Edwards *et al.*, 2004), de la famille Bcl-2, qui prévient l'apoptose intrinsèque (induite par la mitochondrie) de se produire, est une particularité importante dans la capacité des neutrophiles à pouvoir induire leur apoptose rapidement (Fox *et al.*, 2010).

Mcl-1, est une protéine de type Bcl-2 atypique, en ce sens que son domaine PEST (riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)) donnant la capacité de se faire dégrader rapidement par le protéasome confère à cette protéine une très courte demi-vie (environ deux heures) (Akgul *et al.*, 2000, Dzhagalov *et al.*, 2007, Leuenroth *et al.*, 2000). Ceci est en contraste avec les protéines proapoptotiques, de la famille Bcl-2, Bax (Lovell *et al.*, 2008, Weinmann *et al.*, 1999), Bid (Scatizzi *et al.*, 2007) et Bim (Andina *et al.*, 2009, Villunger *et al.*, 2003) qui peuvent persister dans la cellule plus de douze heures. Ce n'est donc pas surprenant qu'un excès de protéines proapoptotiques versus les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est une épée de Damoclès pour les neutrophiles (Fox *et al.*, 2010). Ceci mène éventuellement à la perte du potentiel membranaire mitochondrial (probablement due à la formation de pores dans la membrane externe de la mitochondrie causée par les protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2) et à la progression de l'apoptose des neutrophiles (Kroemer *et al.*, 2007).

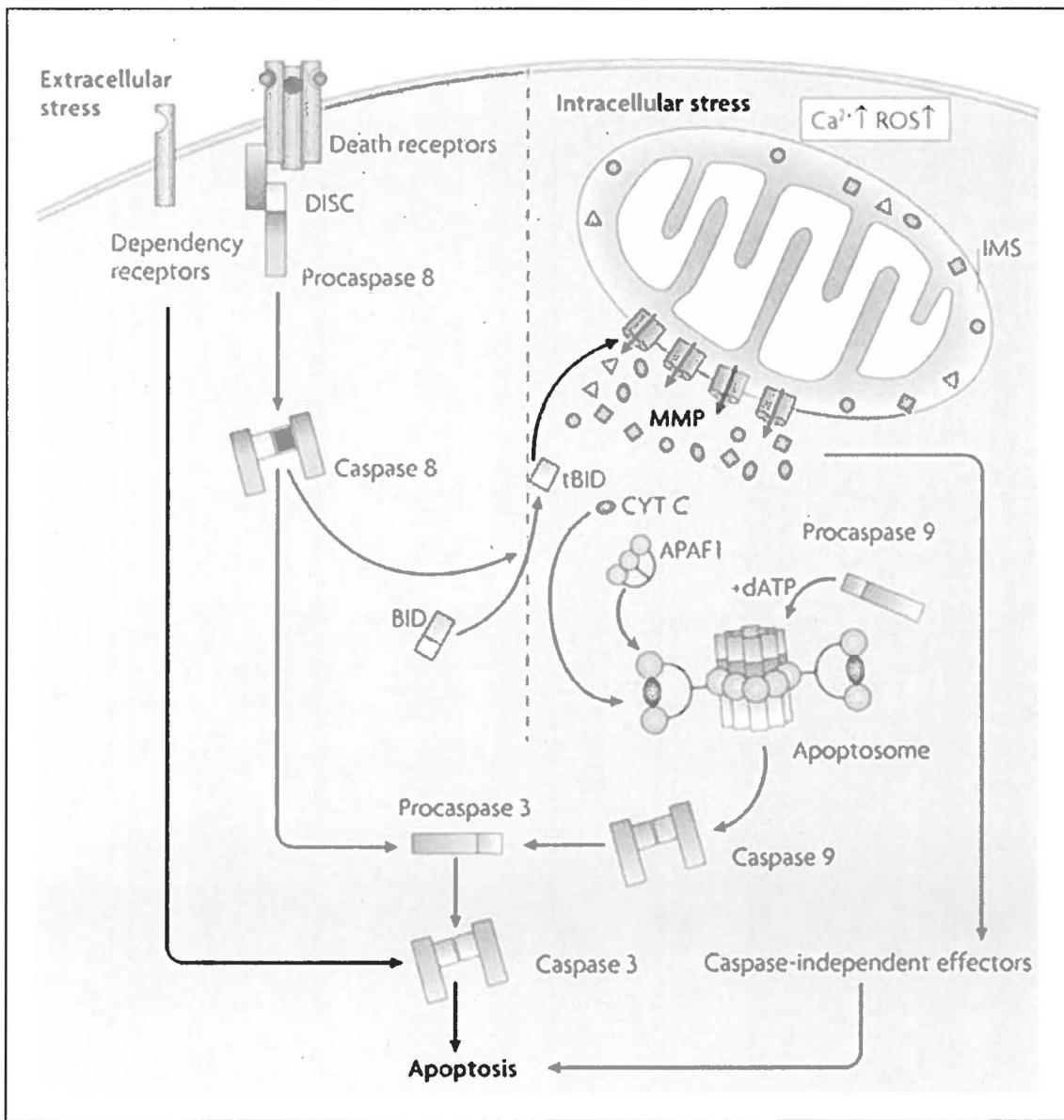


Figure 7 : Schématisation des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque. L'apoptose peut être induite par l'induction de deux cascades biochimiques majeures connues sous les noms de voie extrinsèque et voie intrinsèque (ou mitochondriale). La voie extrinsèque est initiée par la reconnaissance des récepteurs de morts alors que la voie intrinsèque est initiée par des signaux internes comme le Ca^{2+} ou les réactifs oxygénés (ROS). Dans les deux cas, les caspases initiatrices (caspase-8 et caspase-9) activent et catalysent la maturation protéique des caspases exécutrices comme caspase-3. La perméabilisation des pores transmembranaires de la mitochondrie est un fait marquant irréversible dans l'induction de l'apoptose. Le cytochrome C (CYT C) libéré dans le cytosol interagit avec APAF1 et caspase-9 pour former un complexe appelé l'apoptosome. L'activation de ce complexe résulte en l'activation de la caspase-3 menant à l'exécution de l'apoptose. La protéine BID peut activer l'ouverture des pores mitochondriaux suite à l'activation de la caspase-8. Source: (Galluzzi et al., 2009).

L'apport des ROS à l'apoptose des neutrophiles est un autre aspect intéressant à considérer. Les ROS peuvent déclencher la machinerie apoptotique regroupée en grappe à l'intérieur de microenvironnements appelés radeaux lipidiques (Scheel-Toellner *et al.*, 2004). Les ROS semblent affecter l'apoptose des neutrophiles dans certaines déficiences immunitaires comme la granulomatose chronique et le syndrome de Chediak-Higashi (Fischer, 2007). De plus, les neutrophiles sont aujourd'hui reconnus pour générer une nouvelle forme de mort cellulaire appelée la NETose se produisant par un mécanisme dépendant de la NADPH oxydase (Brinkmann *et al.*, 2007). Une autre étude a même suggéré que la formation de NET pourrait se faire à partir de l'ADN mitochondrial, ce qui permettrait aux cellules de rester viables (Yousefi *et al.*, 2009). Les ROS sont aujourd'hui perçus comme de puissants messagers secondaires dans les processus de signalisations moléculaires et cellulaires. La mort des neutrophiles est constitutivement régulée par contre, en présence de pathogènes, la complexité de la réponse inflammatoire augmente, et donc il est parfois difficile de choisir le mode de mort cellulaire le plus bénéfique pour l'hôte (Fox *et al.*, 2010).

2.4.2 La voie extrinsèque

Une autre facette intéressante de l'apoptose des neutrophiles est la dualité du TNF- α sur la survie inflammatoire et sur la voie extrinsèque (Cross *et al.*, 2008, Murray *et al.*, 1997). Le TNF- α active l'apoptose précoce des neutrophiles (après seulement deux heures de traitement) en déclenchant la voie extrinsèque, mais induit une survie tardive (après 24 heures) en initiant l'activation de NF- κ B menant à la transcription de protéines de survie (Kim *et al.*, 2006).

2.4.3 La voie du stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'organelle où les protéines sont synthétisées et repliées. Après leur synthèse, les protéines subissent des modifications post-traductionnelles au sein du RE. Les glycosylations, les lipidations et les formations de liens disulfures sont effectuées sur les protéines nouvellement synthétisées pour qu'elles acquièrent une conformation finale et spécifique appelée conformation native (Ruggiano *et al.*, 2014). Ce processus est opéré par des chaperonnes et des enzymes. Ces dernières peuvent soit glycosyler ou ajouter des groupements lipidiques ou favoriser le repliement ou la formation de liens disulfures des néoprotéines. Ce processus est constamment opérationnel lors de la synthèse protéique pour le maintien de l'homéostasie normale de la cellule. Néanmoins, il se peut que des conditions physiologiques changeantes puissent causer l'augmentation et l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE causant un stress du RE (Ruggiano *et al.*, 2014). Ce stress génère une réponse qui active une machinerie visant à rétablir la conformation native des protéines et la saine homéostasie qui en résulte. Cette réponse est communément appelée la «unfolded protein response» (UPR) (Schroder *et al.*, 2005b).

La UPR est caractérisée par l'arrêt temporaire de la synthèse protéique et par l'activation de signalisations et de facteurs de transcription. La UPR est transmise par trois senseurs localisés dans la membrane du RE : «Inositol-requiring protein 1» (IRE1), «activating transcription factor-6» (ATF6) et «protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK). Les IRE1, ATF6 et PERK possèdent tous un domaine intraluminal du RE reconnaissant les protéines mal repliées et un domaine kinase cytosolique activant d'autres protéines effectrices de la signalisation (Schroder *et al.*, 2005a). L'activation de la UPR mène ultimement à une variété de réponses cellulaires incluant l'atténuation de

la traduction, la transcription de gènes codant des protéines chaperonnes et des enzymes requises pour le repliement des protéines ainsi que la transcription de gènes codant pour le «ER associated degradation» (ERAD) pour la reconnaissance et la dégradation des protéines mal repliées par le protéasome (Rasheva *et al.*, 2009). Cette réponse est mise en place de façon temporaire pour palier au stress du RE et pour rétablir l'homéostasie normale des cellules. Cependant, si cette réponse ne peut correctement rétablir la physiologie normale, l'apoptose est déclenchée.

Le mécanisme exact de l'induction de l'apoptose par le RE est encore largement méconnu et nécessite de plus amples investigations. Chez la souris, la caspase-12 a été démontrée comme étant très fortement impliquée. La caspase-12 est activée par les calpaïnes (Nakagawa *et al.*, 2000), des protéases cytoplasmiques activées par le calcium. Après son activation, la caspase-12 clive la caspase-9 menant à l'activation de la caspase-3 (Morishima *et al.*, 2002). Chez l'homme, la caspase-12 n'est pas fonctionnelle (H. Fischer *et al.*, 2002), ce serait plutôt la caspase-4 (Hitomi *et al.*, 2004) qui opérerait l'activation des caspases initiatrices et effectrices. Les cellules soumises à un stress du RE peuvent s'adapter et survivre grâce à la UPR, mais la décision entre la vie ou la mort cellulaire dépendrait plus largement de l'intensité du stress plutôt que de la spécificité de la voie de signalisation (Rasheva *et al.*, 2009).

La voie apoptotique induite par le stress du réticulum endoplasmique a récemment été mise en évidence chez les neutrophiles (Binet *et al.*, 2010b). Le stress provoqué par l'accumulation de protéines mal repliées à l'intérieur du réticulum endoplasmique est une caractéristique souvent retrouvée chez les cellules sécrétrices et est observée lors de plusieurs maladies incluant le cancer, le diabète, l'obésité et les maladies neurodégénératives (Hetz *et al.*, 2013). Chez les neutrophiles, l'adaptation cellulaire vis-

à-vis le stress du réticulum endoplasmique se traduit par plusieurs changements protéiques et morphologiques incluant l'activation de la voie signalétique PERK/eIF2 α , l'activation de la caspase-4 et la vacuolisation du réticulum endoplasmique (Antoine et al., 2013a, Binet et al., 2010a)

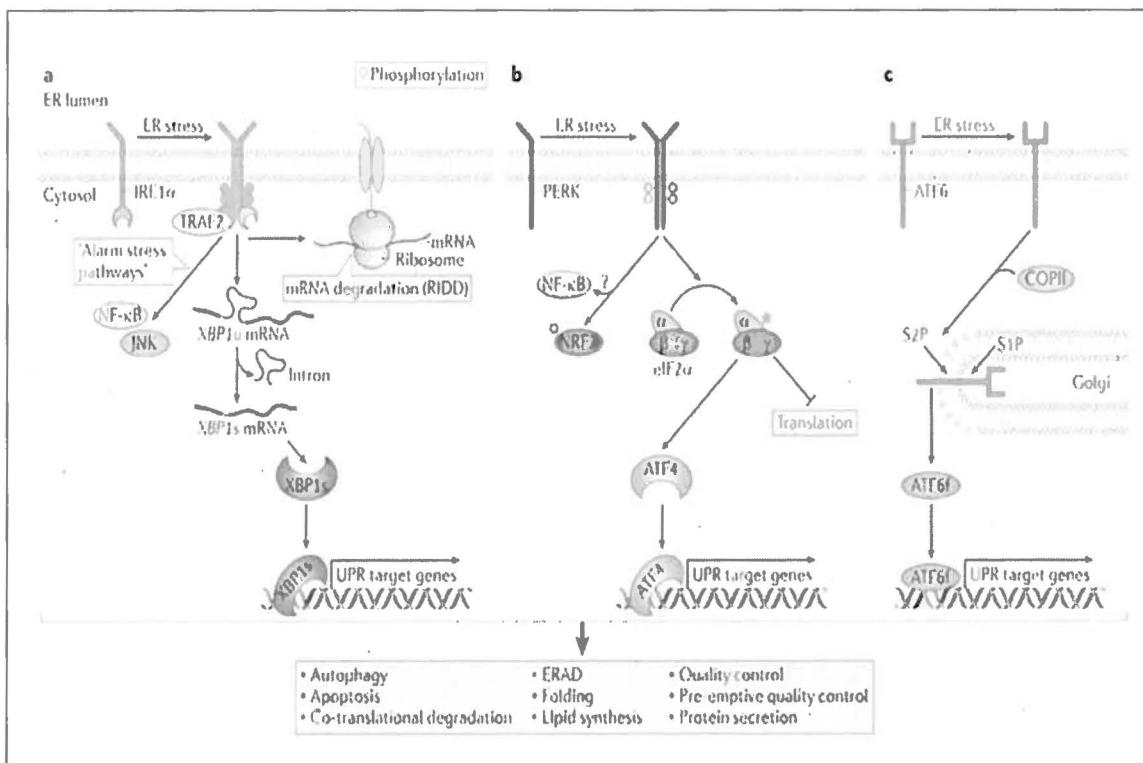


Figure 8: Réponses au stress du réticulum endoplasmique. Trois senseurs signalétiques majeurs sont activés par un stress du réticulum endoplasmique (UPR), a : inositol-requiring protein 1 α (IRE1 α), b : protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum (ER) kinase (PERK) et c : activating transcription factor 6 (ATF6). La dimérisation d'IRE1 α , suivie de son autophosphorylation, active son activité RNase et induit l'activation de *unspliced X box-binding protein 1* (XBPIu) en facteur de transcription actif (XBPIs). Ce dernier régule la transcription des gènes codant des protéines impliquées dans le repliement et la dégradation des protéines (ERAD) ainsi que la synthèse des phospholipides. Suite à son activation PERK phosphoryle le facteur d'initiation *eukaryotic translation initiator factor 2a* (eIF2 α) résultant à l'atténuation de la synthèse protéique. La phosphorylation de eIF2 α entraîne l'expression du facteur de transcription ATF4 contrôlant la transcription des gènes impliqués dans l'autophagie, l'apoptose, le métabolisme des acides aminés et la réponse antioxydante. Suite à un stress du réticulum endoplasmique ATF6 est transporté vers le complexe de Golgi par son association avec *coat protein II* (COPII) d'où il est maturé par des protéases (SP1 et SP2). Son activation mène à la libération d'un fragment dans le cytosol (ATF6f) contrôlant l'expression de gènes codant pour la dégradation protéique (ERAD) et aussi XBPI. L'issu final d'un stress du réticulum endoplasmique dépend de l'intensité du stress. Source: (Hetz, 2012).

3. Le curcuma, une plante médicinale

Les produits végétaux naturels ont été utilisés tout au long de l'histoire humaine à des fins diverses. La plupart des plantes à partir desquelles ces produits naturels sont dérivés ont des milliards d'années. Des dizaines de milliers de ces produits sont fabriqués sous forme de métabolites secondaires par les plantes supérieures comme un mécanisme de défense naturelle contre les maladies et les infections. Beaucoup de ces produits naturels ont une activité pharmacologique ou biologique qui peut être exploitée dans la découverte de médicaments pharmaceutiques et la conception de médicaments. Les médicaments dérivés de plantes ont joué un rôle essentiel dans les soins de santé de nombreuses cultures, à la fois anciennes et modernes (Balunas *et al.*, 2005, Newman *et al.*, 2003). Le système indien de la médecine holistique appelé "Ayurveda" utilise des médicaments ou des formulations principalement à base de plantes pour traiter diverses affections, dont le cancer. Sur au moins 877 médicaments à petites molécules introduits dans le monde entier entre 1981 et 2002, la plupart (61%) proviennent de produits naturels (Newman *et al.*, 2007). Bien que de nombreuses drogues de synthèse soient produites par la chimie combinatoire, les médicaments à base de plantes sont plus adaptés, au moins en termes biochimiques, pour l'usage humain. Néanmoins, la médecine moderne n'a ni tenu en très haute estime, ni encouragé l'usage médicinal de produits naturels (Prasad *et al.*, 2011).

L'utilisation de curcuma remonte à près de 4000 années de la culture védique en Inde, où il a été utilisé comme une épice culinaire et a eu une certaine importance religieuse. Il a probablement atteint la Chine vers l'an 700 de l'ère chrétienne, l'Afrique de l'est vers l'an 800, l'Afrique de l'ouest vers l'an 1200, puis la Jamaïque dans le courant du XVIII^e siècle. En 1280, Marco Polo décrit cette épice, s'émerveillant d'un légume qui présentait

des qualités si semblables à celle du safran. Selon les traités médicaux sanskrits, de la médecine ayurvédique et de la médecine unani (médecine occidentale médiévale issue des méthodes thérapeutiques de la Grèce antique), le curcuma a une longue histoire d'utilisation médicinale en Asie du Sud (Prasad *et al.*, 2011).

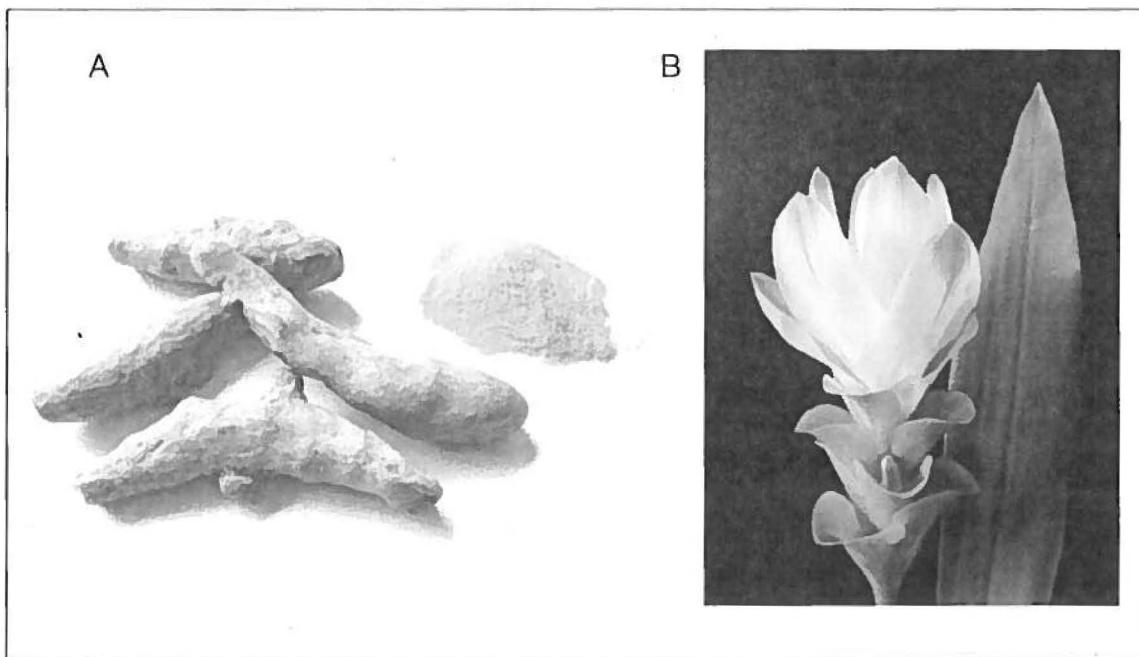


Figure 9 : *Curcuma longa*. Le curcuma est une plante qui a une très longue histoire d'utilisation médicinale, datant de près de 4000 ans. En Asie du sud-est, le curcuma est utilisé comme épice principale mais aussi en tant que composant dans les cérémonies religieuses. En raison de sa couleur jaune brillant, le curcuma est également connu comme «safran des Indes». La médecine moderne a commencé à reconnaître son importance, comme indiqué par les plus de 3000 publications traitant de curcuma qui sont sortis dans les 25 dernières années (Prasad *et al.*, 2011). A : Rhizome. B : Feuille et fleur.

Aujourd'hui, le curcuma est largement cultivé dans les régions tropicales et apparaît sous différents noms dans différentes cultures et pays. Dans le nord de l'Inde, le curcuma est communément appelé «haldi», un mot dérivé du mot sanscrit haridra, et dans le sud, il est appelé «manjal», un mot qui est fréquemment utilisé dans la littérature

tamoule ancienne. Dans de nombreuses cultures, son nom est basé sur le mot latin curcuma. En sanskrit, le curcuma a au moins 53 noms différents, y compris anestha (pas offert en sacrifice), bhadra (favorable ou chanceux), bahula (beaucoup), dhirgharaja (long en apparence), gandhaplashika (qui produit une bonne odeur), gauri (pour faire juste), gharshani (frotter), haldi (qui attire l'attention de sa couleur), haridra (chère à Hari, le Seigneur Krishna), hridayavilasini (qui donne du plaisir au cœur, charmant), jayanti (celui qui gagne sur les maladies), jawarantika (qui guérit les fièvres), kanchani (présentant une couleur dorée), krimighni ou kashpa (tueur de vers), kshamata (capacité), laxmi (prospérité), mangalya (de bon augure), mehagni (tueur de gras), nisha (nuit), nishawa (efface les ténèbres et donne la couleur), patwaluka (poudre parfumée), pavitra (saint), pita (jaune), Pitika (qui donne la couleur jaune), rabhangavasa (qui dissout la graisse), shifa (racine fibreuse), shobhna (de couleur brillante), shiva (gracieuse), soubhagaya (chanceux), survana (de couleur dorée), tamasini (belle comme la nuit), Umavara (Parvati, épouse de Shiva), vaïragi (qui reste libre de désirs), varavarnini (qui donne le teint clair), varna datri (activateur de teint pour le corps), varnini (qui donne couleur), vishagni (tueur de poison) et yoshitapriya (bien-aimé de l'épouse) (Prasad *et al.*, 2011). Tous ces mots pour décrire cette «épice» doivent certainement refléter l'importance de cette plante dans la culture tamoule.

La curcumine est considérée comme responsable des effets médicinaux de la plante *Curcuma longa*. Ce polyphénol est aujourd’hui l’objet de très nombreuses études scientifiques dans les laboratoires de recherches du monde entier. Les effets de la curcumine sont étudiés sur de nombreux systèmes biologiques, mais seulement quelques études ont été réalisées pour comprendre les effets de la curcumine sur l’apoptose et la physiologie des neutrophiles (étant pourtant des acteurs centraux de l’inflammation).

3.1 La curcumine

La curcumine, pigment principal de *Curcuma longa*, a été isolée pour la première fois par Vogel et Pelletier en 1815 (Vogel *et al.*, 1815). Près d'un siècle plus tard, des chimistes polonais établirent sa structure moléculaire et la confirmèrent subséquemment par sa synthèse (Milobedzka *et al.*, 1910, Lampe *et al.*, 1913). Dans la dernière décennie environ 200 articles par année concernant la curcumine étaient publiés, et ce, seulement en rapport avec son application pharmaceutique basée sur les formulations nanotechnologiques (Grynkiewicz *et al.*, 2012). Parallèlement, environ une centaine de brevets étaient déposés chaque année pour atteindre en 2011 près de 12000 résultats pour le mot curcumine dans le serveur SciFinder. Parmi ces résultats, plus de 1000 articles de revue, presque 1500 brevets et 56 essais cliniques (Grynkiewicz *et al.*, 2012). Cette vague scientifique doit certainement provenir du fait que ce composé naturel suggère très clairement être un modulateur métabolique de plusieurs macromolécules biologiques impliquées dans l'homéostasie et la physiologie des mammifères (Aggarwal *et al.*, 2007, Aggarwal *et al.*, 2009).

La curcumine (voir figure 10) est un puissant agent anti-inflammatoire, mais son mécanisme d'action n'est toujours pas totalement compris. La curcumine possède de nombreuses cibles moléculaires incluant les facteurs de transcription, les protéines kinases, les enzymes, les facteurs de croissance, les protéines anti-apoptotiques et les médiateurs inflammatoires (Aggarwal *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2011). La curcumine possède des activités antioxydante, antibactérienne, antifongique, antivirale, anti-inflammatoire, antiproliférative et proapoptotique (Aggarwal *et al.*, 2009). Les effets pléiotropiques de la curcumine en inflammation seraient le résultat de son interaction avec ses nombreuses cibles étalées sur plusieurs systèmes. En considérant la nouvelle

façon de penser relative aux stratégies thérapeutiques en inflammation, qui stipule que la thérapie «multicible» serait plus efficace que la thérapie «monocible», la curcumine pourrait être considérée comme *condimentum vitæ* idéal (Aggarwal *et al.*, 2007). La curcumine est utilisée pour traiter une variété de maladies inflammatoires et autoimmunes incluant le diabète de type I (Babu *et al.*, 1995), la polyarthrite rhumatoïde (Moon *et al.*, 2010), le psoriasis (Heng *et al.*, 2000) et les maladies inflammatoires de l'intestin (Taylor *et al.*, 2011). La figure 10 montre les structures moléculaires de la curcumine.

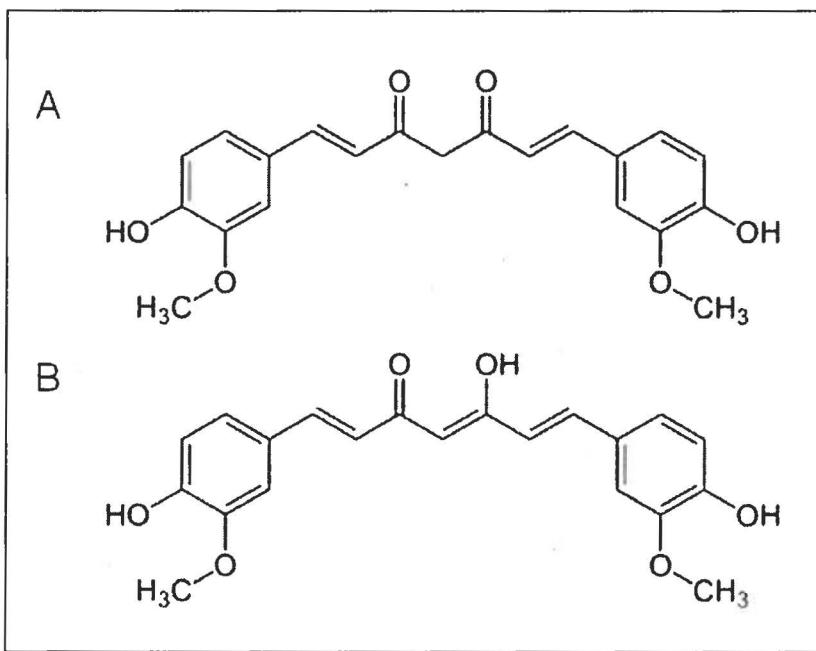


Figure 10 : Structures moléculaires de la curcumine. Le nom chimique de la curcumine [CAS No. 458-37-7] est (1E, 6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione et est souvent appelé diferruloylmethane (dans ce cas-ci la carbone central est désigné C-1). La curcumine existe principalement (si ce n'est pas exclusivement) en tant qu'équilibre tautomérique céto-énol, A : forme céto. B : forme enol. La curcumine est aussi utilisé comme colorant naturel connu sous l'appellation «Natural Yellow 3» ou E100. La composition atomique de la curcumine ($C_{21}H_{20}O_6$) correspond à une masse molaire de 368,39 g/mole (Grynkiewicz *et al.*, 2012).

La faible toxicité de la curcumine, même à des doses élevées, a été bien établit à travers plusieurs essais cliniques de phase I indiquant que la curcumine est bien tolérée jusqu'à des doses pouvant atteindre 12 g par jour (Anand *et al.*, 2007). Par contre, la curcumine possède une faible biodisponibilité. Plusieurs approches ont donc été élaborées afin d'augmenter la biodisponibilité de la curcumine dans l'organisme incluant l'addition de piperine (provenant du poivre noir), de nanoparticules, de liposomes, de complexes phospholipidiques et d'analogues structuraux (Gupta *et al.*, 2013).

3.2 La curcumine et le stress oxydatif

Le stress oxydatif causé par l'activation des phagocytes contribue, par exemple, à la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde. Comparé aux sujets sains, la production de superoxydes par les phagocytes est supérieure chez les patients souffrant d'arthrite (Miesel *et al.*, 1996). Aussi, en tenant compte du fait que les neutrophiles sont les cellules immunitaires les plus abondantes dans la circulation sanguine, leur activation excessive peut mener à l'athérosclérose. L'activation de la NADPH oxydase semble être responsable de l'augmentation de la production de superoxydes durant l'initiation de l'athérosclérose (Kinkade *et al.*, 2013).

Or, les propriétés anti-inflammatoires de la curcumine sont classiquement attribuées à ses capacités antioxydantes. La curcumine altère le statut redox des cellules, de par sa structure moléculaire (Toda *et al.*, 1985) mais aussi de par sa capacité à moduler l'activité des facteurs de transcription impliqués dans le statut redox des cellules (Soetikno *et al.*, 2013). En effet, la curcumine inhibe la production de superoxydes (O_2^-) par la NADPH oxydase en interagissant directement avec son assemblage, tel que démontré par des tests de reconstitution *in vitro* utilisant des neutrophiles équins

(Derochette *et al.*, 2013). De plus, la nouvelle formulation soluble de curcumine, NDS27, inhibe la production intra- et extracellulaire de superoxydes chez les HL-60, et que l'effet est plus important chez les neutrophiles matures que chez les HL-60. Les neutrophiles matures étant plus actifs à produire des ROS que chez les HL-60, l'inhibition plus marquée du NDS27 suggère que la curcumine puisse cibler d'autres enzymes impliquées dans la flambée oxydative comme la myéloperoxydase. (Derochette *et al.* 2013). Ces résultats suggèrent que les phagocytes sont d'importantes cibles dans le but de contrôler les dommages inflammatoires associés à la production de superoxydes.

Ultimement, l'action d'inhibition de la synthèse des réactifs oxygénés par la NADPH oxydase peut engendrer un dérèglement dans le statut redox des cellules. L'expression de plusieurs médiateurs inflammatoires est sous le contrôle de facteurs de transcription sensibles au statut redox. La prémissse veut que la curcumine agisse directement sur le statut redox à cause de sa structure moléculaire, mais aussi indirectement en altérant l'expression et la synthèse de la machinerie redox des cellules en modulant l'activation des facteurs de transcription impliqués dans la réponse inflammatoire et au stress oxydatif.

La production des ROS par les phagocytes est une étape majeure de la réponse inflammatoire. Si la production de superoxydes est mal régulée elle peut perpétrer de sérieux dommages aux tissus environnents et amplifier la réponse inflammatoire. La persistance de l'inflammation causée par la présence de superoxydes peut mener à des maladies autoimmunes incluant la polyarthrite rhumatoïde et l'athérosclérose (Kang *et al.*, Li *et al.*, 2012). Conséquemment, l'inhibition de la production de superoxydes par les phagocytes est pertinente dans la prévention ou le traitement des maladies chroniques causées par le stress oxydatif.

D'un autre côté, l'activité de la NADPH oxydase est essentielle à la défense immunitaire. Cette enzyme est localisée dans la membrane du phagolysosome et sert principalement à tuer les microbes en les digérant avec l'aide des protéases pendant la phagocytose. L'importance de cette enzyme est révélée par la maladie héréditaire appelée granulomatose chronique dans laquelle les phagocytes sont incapables de produire une suffisante de ROS via la NADPH oxydase. Les patients qui souffrent de cette condition sont confrontés à de récurrentes infections dues à l'incapacité du système immunitaire à tuer les microbes envahissants. Donc, l'inhibition d'une enzyme aussi importante que la NADPH oxydase dans les réponses immunitaires doit être considérée lorsque la curcumine est utilisée pour prévenir l'inflammation.

3.3 Effet de la curcumine sur les facteurs de transcriptions

L'activité de plusieurs facteurs de transcriptions, incluant Nrf2/keap1, AP-1, PPAR- γ et NF- κ B, semble être modulée par la curcumine (Aggarwal *et al.*, 2009). Le NF- κ B est reconnu pour jouer un rôle dans le contrôle de l'inflammation en affectant la croissance cellulaire, l'apoptose et la réponse au stress (Shehzad *et al.*, 2013a). Chez les neutrophiles, le facteur de transcription NF- κ B promeut la survie cellulaire de par l'expression subséquente des protéines associées à son activation. Finalement, NF- κ B est un facteur de transcription ubiquitaire du système immunitaire et serait d'une importance critique dans l'induction de l'apoptose par la curcumine (Anto *et al.*, 2000).

Chez les neutrophiles, la régulation des cytokines et des chimiokines dépend largement de l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP (Mayer *et al.*, 2013). Le NF-

κ B joue un rôle central dans l'orchestration de la réponse inflammatoire chez les neutrophiles. Son activation est impliquée dans l'expression de plusieurs cytokines proinflammatoires, incluant IL-8 (Stegmaier *et al.*, 2008), une cytokine dont l'expression est dépendante de l'activation de NF- κ B. L'inhibition des cytokines et des chimiokines peut prévenir l'infiltration des neutrophiles dans les tissus. Or, il a récemment été démontré que la curcumine inhibe la migration des neutrophiles au site inflammatoire (dans un modèle murin de maladies inflammatoires de l'intestin) en réduisant la production des chimiokines, notamment les MIP-1 α et MIP 2, chez les macrophages et les cellules épithéliales du colon (lignée cellulaire YAMC) (Larmonier *et al.*, 2011). Une autre étude a montré que la curcumine bloque la migration des neutrophiles par un mécanisme inhibant les signaux transmis par les récepteurs d'IL-8 (Takahashi *et al.*, 2007). Aussi, la curcumine inhibe l'activation de NF- κ B dans les fibroblastes L929 et la lignée de monocyte/macrophage humain Mono Mac 6 réduisant l'expression et l'activité biologique du TNF- α . Le TNF- α induit la production de l'IL-1 β et, ensemble, jouent un rôle significatif dans plusieurs maladies inflammatoires aiguës et chroniques (Chan, 1995). Mises ensemble, ces données récentes nous donnent le droit de se questionner sur l'importance de NF- κ B dans les effets de la curcumine chez les neutrophiles. Or, les effets de la curcumine sur l'activation de NF- κ B chez les neutrophiles humains n'ont jamais été étudiés jusqu'à maintenant.

3.4 Effet de la curcumine sur l'apoptose

L'activation des cascades de signalisations cellulaires reliées à l'induction de l'apoptose semble jouer un rôle majeur dans les effets pléiotropiques de la curcumine. En fait, l'apoptose semble être le type de mort cellulaire le plus souvent associé à l'exposition à

la curcumine. La curcumine induit l'apoptose de lignées cellulaires (Logan-Smith *et al.*, 2001) et aussi des cellules primaires (Antoine *et al.*, 2013a). La pertinence d'étudier les mécanismes d'induction de l'apoptose par la curcumine chez les neutrophiles est considérable compte tenu de l'importance capitale de ces cellules en inflammation. Les récentes études sur la curcumine ont permis de démontrer que cette molécule est capable d'induire l'apoptose par plusieurs mécanismes.

Une étude récente a démontré que la curcumine possède un effet proapoptotique sur les neutrophiles. Ils ont attribué les capacités proapoptotiques de la curcumine à l'activation de la MAP kinase p38 et de la caspase-3 (Hu *et al.*, 2005). Outre la voie extrinsèque et intrinsèque, une étude a montré que la curcumine active la voie apoptotique du stress du réticulum endoplasmique chez les HL-60 (lignée leucémique promyélocyttaire) en induisant l'apoptose et la réponse au stress du réticulum endoplasmique (unfolded protein response, UPR) par l'activation de la voie PERK/eIF2 α et caspase-4 (Pae *et al.*, 2007). Or, il se trouve que cette nouvelle voie apoptotique a récemment été observée chez les neutrophiles (Binet *et al.*, 2010b).

3.5 Essais cliniques et précliniques portant sur l'utilisation de la curcumine

Plusieurs essais cliniques portant sur l'utilisation de la curcumine pour le traitement de maladies inflammatoires ou pour le traitement du cancer ont été réalisés jusqu'à présent. Les essais sur les animaux ont montré que la curcumine est rapidement métabolisée par biotransformation hépatique puis excrétée dans les selles. Conséquemment, cela procure à la curcumine une faible biodisponibilité. Chez les rats, une dose intraveineuse de 40 mg de curcumine par kg de poids corporel résulte en une clairance plasmatique complète une heure post-injection, alors qu'une dose orale de 500

mg de curcumine par kg de poids corporel résulte à une concentration plasmatique maximale de 1,8 ng de curcumine par ml, retrouvée majoritairement sous forme sulfatée ou glucuronidée (Ireson *et al.*, 2001).

Les essais cliniques portant sur les effets de la curcumine chez les humains font le plus souvent l'objet d'études sur les cancers. Les études sur la pharmacocinétique de la curcumine sont peu nombreuses, mais la plupart s'accorde pour dire que la curcumine n'atteint que de très faibles concentrations plasmatiques et ce, malgré une dose élevée pouvant même aller jusqu'à 8 g par jour. Malgré sa faible biodisponibilité, la grande absence de toxicité observée par la curcumine rend cette molécule sécuritaire du point de vue médicamenteux. Le problème de la biodisponibilité et de la métabolisation rapide de la curcumine, a poussé les chercheurs à se concentrer sur les bénéfices que pourraient apporter la curcumine complexée avec d'autres substances afin d'augmenter sa distribution systémique. Une telle substance ayant été étudiée est la pipérine, un alcaloïde retrouvé dans le poivre. Chez les humains, l'ajout de 20 mg de pipérine à 2 g de curcumine permet d'augmenter de 20 fois la concentration plasmatique de curcumine. Ceci serait largement attribuable à l'inhibition de la glucuronidation hépatique et de l'effet de premier passage au niveau intestinal (Shoba *et al.*, 1998).

Une autre approche à l'essai consiste à complexer la curcumine avec un phospholipide, formant ainsi une structure appelée phytosome. Par exemple, le complexe phosphatidylcholine-curcumine (Meriva®) s'intègre mieux dans les membranes cellulaires lipophiles, augmentant ainsi la biodisponibilité de la curcumine. Chez les rats, la concentration plasmatique de curcumine est 5 fois plus élevée avec Meriva qu'avec la curcumine seule (Marczylo *et al.*, 2007). D'autres résultats ont montré que 450 mg du complexe curcuminoïdes-phosphatidylcholine Meriva était absorbé avec la même

efficacité que 4 g de *Curcuma longa*, reflétant une augmentation significative de la biodisponibilité de la curcumine par le complexe Meriva (Jurenka, 2009).

Les essais effectués sur les animaux et sur les humains démontrent de façon générale que la curcumine diminue l'inflammation dans une variété de conditions. La diversité des mécanismes ciblés fait de la curcumine une molécule de choix pour le traitement d'un large spectre de type de conditions inflammatoires et de cancers. L'intérêt de la recherche se reflète par le nombre d'essais cliniques en phase II et III en cours ou sur le point de se terminer (Jurenka, 2009). Le tableau IV compile certains essais cliniques portant sur les effets anti-inflammatoires de la curcumine.

Même si la limitation principale de la curcumine réside dans sa biodisponibilité, les recherches sont menées de façon active et investiguent les façons de créer des complexes moléculaires afin d'augmenter son efficacité ou son absorption. Les résultats issus des essais cliniques en cours permettront de clarifier le potentiel de la curcumine autant pour le traitement des conditions inflammatoires que pour les cancers (Jurenka, 2009). Le tableau V compile certains essais cliniques sur les effets anticancéreux de la curcumine.

Tableau IV : Essais cliniques portant sur les effets anti-inflammatoires de la curcumine.

# d'identification de l'essai clinique	Condition inflammatoire	Localisation	Intervention	Phase d'essai, Année
NCT00752154	Arthrite rhumatoïde	UCLA	Curcumine, 4-12 gr / jour	Étude pilote, 2009
NCT00792818	Arthrose du genou	Université Mahidol, Conseil National de la Recherche, Thaïlande	Extraits de <i>Curcuma longa</i> , Ibuprofène	Phase III, 2009
NCT00793130	Colite ulcéreuse	Centre médical Sourasky, Tel-Aviv	CollectTM - (curcumine, 1 gr / jour, thé vert, sélénium)	Inconnu, 2009
NCT00779493	Syndrôme du colon irritable	Kaiser Permanente	Curcumine, 900 mg, deux fois par jour	Phase IV, 2009
NCT00528151	Neuropathie optique héréditaire de Leber	Université Mahidol	Curcumine, 250 mg, deux fois par jour	Phase III, 2009
NCT00595582	Détérioration cognitive légère	Université de la Louisiane	Curcumine + Biopérine, 5,4 gr / jour	Inconnu, 2009

Tableau V : Essais cliniques portant sur les effets anticancéreux de la curcumine

# d'identification de l'essai clinique	Type de cancer	Localisation	Intervention	Phase d'essai, Année
NCT00365209	Cancer du colon (prévention)	<i>Chao Family Comprehensive Cancer Center</i>	Curcumine	Phase II, inconnue
NCT00118989	Cancer du colon (prévention)	Université de Pennsylvanie	Complexe de Curcuminoïdes 4 gr / jour	Phase II, 2009
NCT00641147	Polypose adénomateuse familiale	Université John Hopkins	Curcumine, 700 mg, deux fois par jour	Phase II, 2013
NCT00745134	Cancer colorectal	<i>MD Anderson Cancer Center</i>	Curcumine, 4 gr / jour, Capecitabine	Phase II, 2010
NCT00486460	Cancer du pancréas	Centre médical Sourasky, Tel-Aviv	Gemcitabine, Curcumine, Celebrex (doses inconnues)	Phase III, inconnue
NCT00094445	Cancer du pancréas	<i>MD Anderson Cancer Center</i>	Curcumine, 8 gr / jour	Phase II, 2009
NCT00113841	Myélome multiple	<i>MD Anderson Cancer Center</i>	Curcumine + Biopérine, 2 gr, deux fois par jour	Étude pilote, 2008
NCT00689195	Ostéosarcome	<i>Tata Memorial Hospital</i>	Curcumine et Ashwagandha (doses inconnues)	Phase I et II, 2012
NCT00475683	Mucosité buccale - Enfants sur la chimiothérapie	<i>Hadassah Medical Organization</i>	Extrait liquide de curcumine, 10 à 30 gouttes trois fois par jour	Phase III, 2009

DEUXIÈME PARTIE: ARTICLES

ARTICLE 1

Mechanisms involved in curcumin-induced human neutrophil apoptosis: Evidence that curcumin activates the endoplasmic reticulum stress-induced cell apoptosis pathway.

Les mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose des neutrophiles par la curcumine: Évidence de l'activation de la voie apoptotique du stress du réticulum endoplasmique par la curcumine.

Francis Antoine¹ et Denis Girard¹

¹ Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Qc., Canada.

L'article est présenté tel que publié dans SAGE Open Medicine le 1er juin 2013. Le numéro des figures a été changé pour suivre un décompte continu à travers le cours de la thèse.

Contribution : À titre de premier auteur, j'ai réalisé toutes les expériences présentes dans cette publication. J'ai aussi participé à la rédaction de chaque section du manuscrit.

RÉSUMÉ

La curcumine a déjà été rapportée pour induire l'apoptose des neutrophiles de façon accélérée, mais son mécanisme d'action est encore mal défini. Ici, nous confirmons que la curcumine induit l'apoptose des neutrophiles tel qu'évaluée par cytologie et par l'expression membranaire de l'annexine-V et du CD16. De plus, la curcumine induit l'activation de la caspase-3 et le clivage des protéines du cytosquelette lamine β 1 et vimentine. En addition, la curcumine active les protéines PERK et eIF2 α et réduit la synthèse *de novo* des protéines ainsi que l'expression des protéines HSP70 et HSP90. Nous concluons donc que la curcumine agit à titre d'activateur du stress du réticulum endoplasmique chez les neutrophiles humains. La capacité de la curcumine à activer la voie apoptotique du stress du réticulum endoplasmique fait partie de ses modes d'action sur les cellules primaires comme les neutrophiles.

Mots clés : curcumine, neutrophile, inflammation, apoptose, réticulum endoplasmique

ABSTRACT

Curcumin was previously reported to accelerate the apoptosis of neutrophils, but the mechanism is unclear. Herein, we confirmed that curcumin induces the apoptosis of human neutrophils as assessed by cytology, and also by the increase in the cell surface expression of annexin-V and CD16 shedding. Curcumin activated caspase-3 and the cleavage of the two cytoskeletal proteins lamin β 1 and vimentin. In addition, curcumin activated the proteins RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2 α) and reduced *de novo* protein synthesis and the expression of the two chaperone proteins, HSP70 and HSP90. We conclude that curcumin acts as an endoplasmic reticulum stressor in human neutrophils. The ability of curcumin to activate the endoplasmic reticulum stress-induced cell apoptotic pathway is part of its mode of action in primary cells like mature neutrophils.

Keywords: Curcumin, neutrophils, inflammation, apoptosis, endoplasmic reticulum

INTRODUCTION

Polymorphonuclear neutrophils are the most abundant cell type of the immune system. They are phagocytes that undergo apoptosis spontaneously and play a key role in inflammation, being among the first cells to arrive at an inflammatory site. In addition, neutrophils are the main source of preformed inflammatory mediators and proteolytic enzymes contained in the granules (Akgul *et al.*, 2001, Duffin *et al.*, 2010). The rate of apoptosis of neutrophils is of great importance in the regulation of inflammation since this rate may vary under different activation states, resulting in recurrent infections (high or increased apoptotic rate) or autoimmune disorders and persistent chronic inflammation (low or decreased apoptotic rate) (Duffin *et al.*, 2010, Geering *et al.*, 2011). Therefore, identifying new apoptotic regulators and understanding the mode of action of some previously identified factors represent important potential therapeutics targets for control of inflammation caused by neutrophils.

For centuries, curcumin has been used to treat many human autoimmune and chronic inflammatory diseases, including type I diabetes (Babu *et al.*, 1995), arthritis (Moon *et al.*, 2010), psoriasis (Heng *et al.*, 2000), and inflammatory bowel disease (Taylor *et al.*, 2011). Curcumin is, in fact, used as a general anti-inflammatory agent, but its precise mechanism of action is not completely understood. There are many molecular targets of curcumin, including transcription factors, protein kinases, enzymes, growth factors, anti-apoptotic proteins and inflammatory mediators (Aggarwal *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2011). Curcumin exerts antioxidant, antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antiproliferative and proapoptotic effects (Aggarwal *et al.*, 2007, Aggarwal *et al.*, 2009). Mostly, cell death induced by curcumin treatment is called apoptosis (Pae *et al.*, 2007). It

was previously reported that the proapoptotic activity of curcumin involves activation of caspases and mitochondrial dysfunction triggered by enhanced Bax expressions in cell lines (Karmakar *et al.*, 2006, Sen *et al.*, 2005). Curcumin was identified recently as a proapoptotic molecule for neutrophils, acting by a p38-dependent mechanism involving caspase-3 activation (Hu *et al.*, 2005). Interestingly, involvement of the endoplasmic reticulum (ER) stress-induced apoptosis pathway has been recently demonstrated in curcumin-induced promyelocyte HL-60 cells (Pae *et al.*, 2007). Since we have recently documented that the ER stress-induced cell apoptosis pathway is functional in arsenic trioxide (ATO)-induced human neutrophils (Binet *et al.*, 2010a) and since the mode of action of curcumin is unclear, we decided to investigate the possibility that curcumin may induce the apoptosis of neutrophils by altering the ER stress-induced cell apoptotic pathway.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Curcumin, arsenic trioxide (ATO), cycloheximide (CHX) and dimethyl sulphoxide (DMSO) were purchased from Sigma Chemical Company (St-Louis, MO, USA). RPMI 1640 and Hank's balanced salt solution (HBSS) were purchased from Calbiochem International (La Jolla, CA, USA). The 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (25 mM) and penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 µg/ml) (p/s) were obtained from Gibco cell culture (Life Technologies).

Isolation of human neutrophils

Neutrophils were isolated from the venous blood of consenting healthy individuals by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Baie-d'Urfé, QC, Canada) according to our institutionally approved procedures (Goncalves *et al.*, 2010, Pelletier *et al.*, 2004). Cell viability (>99%) was monitored by trypan blue exclusion, and the purity (>98%) was verified by cytology by the Hema 3 Stain Set (Biochemicals Sciences Inc., Swedesboro, NJ, USA).

Assessment of the apoptosis of neutrophils by cytology

Briefly, freshly isolated human neutrophils (1, 5 and 10×10^6 cells/ml in RPMI 1640 HEPES p/s supplemented with 10% autologous serum) were incubated for different periods of time in the presence of various concentrations of curcumin (1-100 μM). The proapoptotic drug arsenic trioxide (ATO) (5 μM) was used as a positive control (Binet Cavalli 2006). Cytocentrifuged preparations of neutrophils were performed and processed as documented previously (Goncalves *et al.*, 2010, Pelletier *et al.*, 2004).

Assessment of the apoptosis of neutrophils by flow cytometry

CD16 expression and annexin-V binding were used to confirm the ability of curcumin to induce the apoptosis of neutrophils. After 24 h of incubation with various concentrations of curcumin, the cells were suspended at concentrations of 10×10^6 cells/ml, washed and pre-incubated for 30 min at 4°C (light protected) with 20% autologous serum to prevent non-specific binding via Fc receptors (FcRs). The cells were then washed, resuspended at 1×10^6 cells/ml in phosphate buffer (PBS) and incubated with 2 μl of FITC-annexin-V for 15 min at room temperature (light protected) prior to fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis (Pelletier *et al.*, 2004).

Processing of caspase-3 by curcumin in human neutrophils

Cells were treated with curcumin for different periods of time (15 min to 4 h), and the processing of caspase-3 was assessed by monitoring the degradation/cleavage of the procaspase-3 form by immunoblotting, using a rabbit anti-caspase-3 antibody (BD PharMingen, Mississauga, ON, Canada) (Binet *et al.*, 2006).

Western blots

Neutrophils (10×10^6 cells/ml in 96-well plates) were incubated in the presence or absence of 10 or 50 μM curcumin for 24 h and then harvested for the preparation of cell lysates in 4X Laemmli sample buffer. Aliquots corresponding to 500,000 cells were loaded onto 10% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred from gel to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Non-specific sites were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline (TBS)-Tween (0.1%) for 1 h at room temperature. Membranes were incubated with monoclonal anti-human Lamin β 1 (1:1,000, clone C20; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-human vimentin (1:1,000, clone V9; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-heat shock proteins (HSP70 (clone SPA-810) and HSP90 (clone SPA-830)) purchased from Stressgen (Ann Arbor, MI, USA), overnight at 4°C. The membranes were then washed with TBS-Tween and incubated with appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody directed against the respective primary antibody for 1 h at room temperature in TBS-Tween. Protein expression was revealed using enhanced chemiluminescence (ECL)-Western blotting detection system. Protein loading was verified by staining the membranes with Coomassie blue at the end of the experiments. Densitometry analysis was performed using the FluorChem2 software.

Metabolic labelling and de novo protein synthesis

Cells (10×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium without methionine nor cysteine, and supplemented with 10% autologous serum) were metabolically labelled with 4,625 MBq of the Redivue Pro-Mix L-[^{35}S] in vitro cell labelling mix (PerkinElmer, Boston, MA, USA)

in the presence or absence of agonists, as indicated in the appropriate figure legend, for 24 h, as previously described (Binet *et al.*, 2006, Bouchard *et al.*, 2004). Newly synthesized polypeptide was then visualized by autoradiography after separation of proteins by electrophoresis.

Phosphorylation events

Neutrophils (40×10^6 cells/ml in RPMI 1640 HEPES p/s) were stimulated from 1 to 5 h with the agonists. Cells were lysed in 4X Laemmli sample buffer, and aliquots corresponding to 1×10^6 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF or nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1 h at room temperature with TBS-Tween containing 5% of non-fat dry milk (Carnation, Don Mills, ON, Canada). After washing, the antiphosphospecific eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2 α) (Cell Signalling Technology Inc., Danvers, MA, USA) or protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) antibodies were added at a final concentration of 1:1,000 in TBS-Tween. The membranes were incubated overnight at 4°C and then washed with TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) at a final concentration of 1:25,000 in TBS-Tween. Equivalent loading of proteins was assessed after stripping of membranes and staining with an anti-actin antibody (clone AC-40; Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, ON). Protein expression was revealed using an ECL-Western blotting analysis detection system.

Statistical analysis

The data are reported as mean \pm standard error of mean (SEM). Analysis of variance was used to compare the means of different treatments. If significance was identified, individual comparison was subsequently made with the Bonferroni test using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Curcumin induces the apoptosis of neutrophils in a cell- and concentration-dependent manner

As illustrated in Figure 11(a), the rapid proapoptotic activity observed after 6 h of treatment with 50 μ M of curcumin, as assessed by cytology, was significantly increased relative to spontaneous apoptosis (SA), but only when the concentration of cells was adjusted to 1×10^6 cells/ml. As the concentration of cells was increased, the proapoptotic activity of curcumin decreased; and this was particularly significant when neutrophils were plated at a concentration of 10×10^6 cells/ml. However, as illustrated in Figure 11(b), after 24 h of treatment, curcumin significantly increased the apoptotic rate when cells were plated at 1, 5 and 10×10^6 cells/ml. We then determined the concentration-dependent proapoptotic activity of curcumin when cells were plated at 10×10^6 cells/ml, a cell concentration routinely used to obtain between 30 and 50% of apoptotic neutrophils after 24 h (SA).

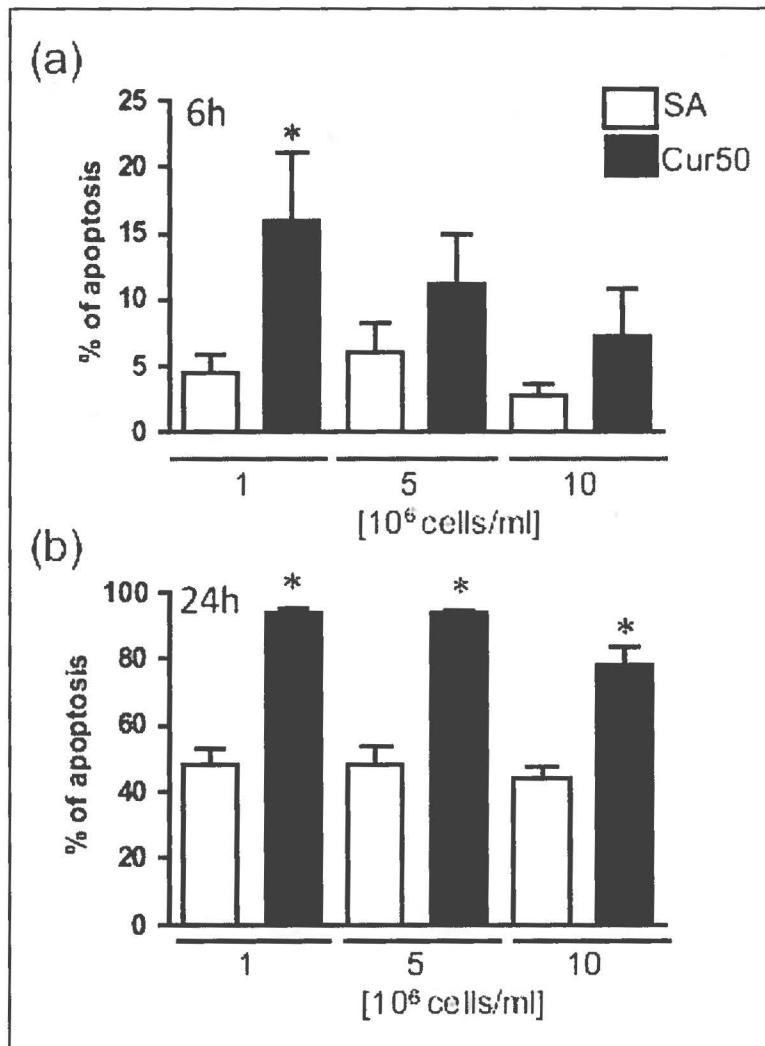


Figure 11: Modulation of the human neutrophils apoptotic rate by curcumin. Fresh human neutrophils were isolated and incubated at $1, 5$ or 10×10^6 cells/ml for (a) 6 h and (b) 24 h in the presence or absence of 50 μM curcumin (Cur50). Apoptosis was assessed by cytology as described in Materials and methods. Results are means \pm SEM ($n \geq 3$). * $p < 0,05$ versus SA. SA: spontaneous apoptosis; PMN: polymorphonuclear neutrophils cell; SEM: standard error of mean.

As illustrated in Figure 12(a), curcumin significantly increased apoptosis in a dose-dependent manner, except at the lowest concentration of 1 μ M. As expected, ATO induced PMN apoptosis (Binet *et al.*, 2006, Binet *et al.*, 2010b). In parallel, we tested the potential necrotic effect of curcumin, curiously undocumented before this study, and observed that necrosis never exceeded ~5% for all tested concentrations, except for 100 μ M curcumin, where about 20% of the cells were necrotic, as assessed by trypan blue exclusion assay (inset, Figure 12(a)). Therefore, except where indicated, curcumin was used at a concentration of 50 μ M (Cur50) in subsequent experiments. We then confirmed the above-mentioned results by flow cytometry. As expected, the number of annexin-V positive cells was increased by curcumin treatment when compared to untreated cells and, conversely, was decreased when cells were treated with the anti-apoptotic cytokine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Figure 12(b)). As expected, the number of CD16 negative cells (Dransfield *et al.*, 1994) was increased by curcumin treatment and decreased by GM-CSF versus SA (Figure 12(c)).

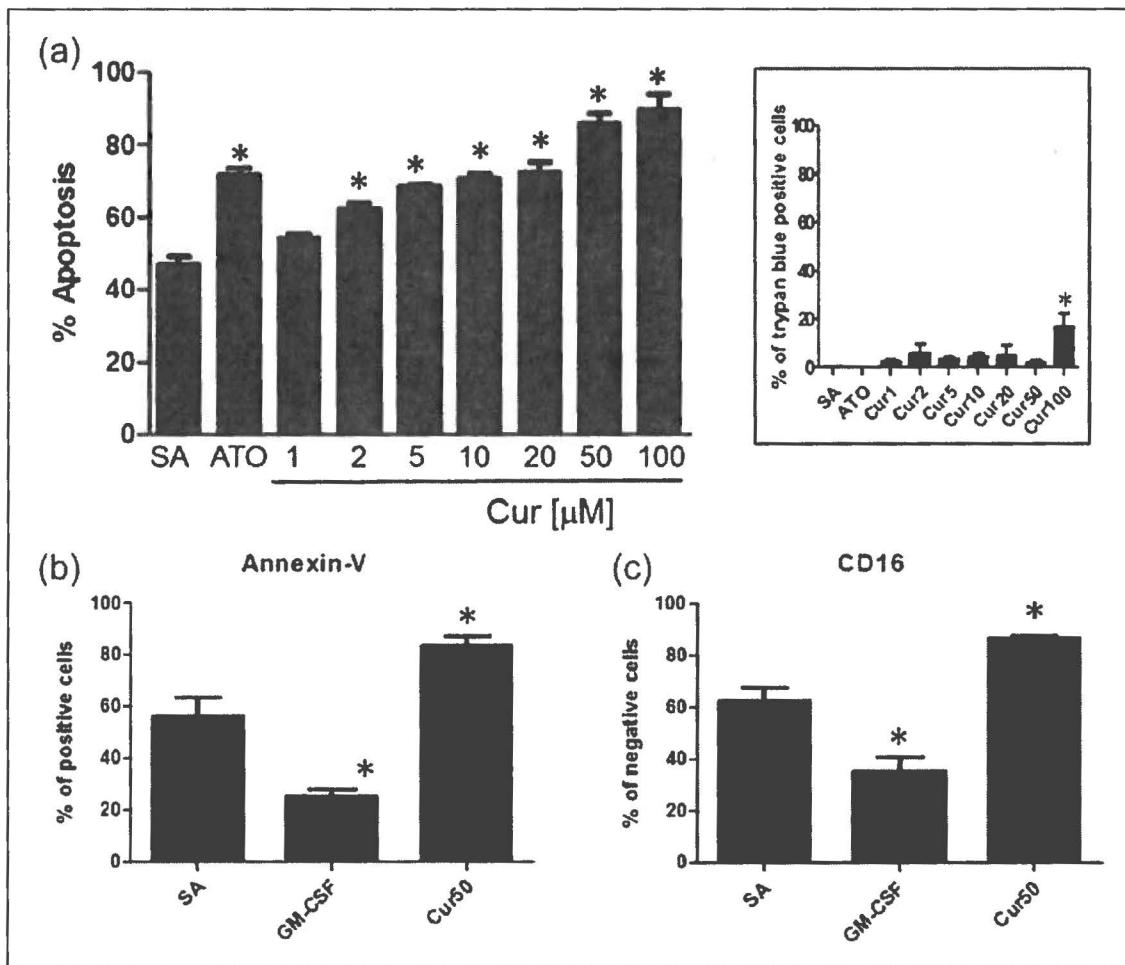


Figure 12: Curcumin accelerates the apoptosis of neutrophils in a concentration-dependent manner. Cells (10×10^6 cells/ml) were incubated for 24 h with buffer (SA), 5 μ M ATO (positive control) or an increasing concentration of curcumin. Apoptosis was assessed by (a) cytology or flow cytometry after staining with (b) annexin-V or (c) CD16 as described in Materials and methods. Inset in (a): cell viability was evaluated by trypan blue exclusion. ($n \geq 3$) * $p < 0.05$. SA: spontaneous apoptosis; PMN: polymorphonuclear neutrophils cell; ATO: arsenic trioxide; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Curcumin activates caspase-3 and the degradation of cytoskeletal proteins but inhibits de novo protein synthesis in human neutrophils

As illustrated in Figure 13(a), curcumin induced the process of procaspase-3 within 2 h of treatment. We then determined whether or not curcumin could induce the degradation of lamin β 1 and vimentin, two proteins known to be cleaved by caspases during the apoptosis of neutrophils. Curcumin at 10 μ M slightly induced the degradation of those two proteins (Figure 13(b)), whereas at 50 μ M, like ATO, drastically degraded both lamin β 1 and vimentin when compared to SA, indicating that apoptosis was accelerated by curcumin in human neutrophils.

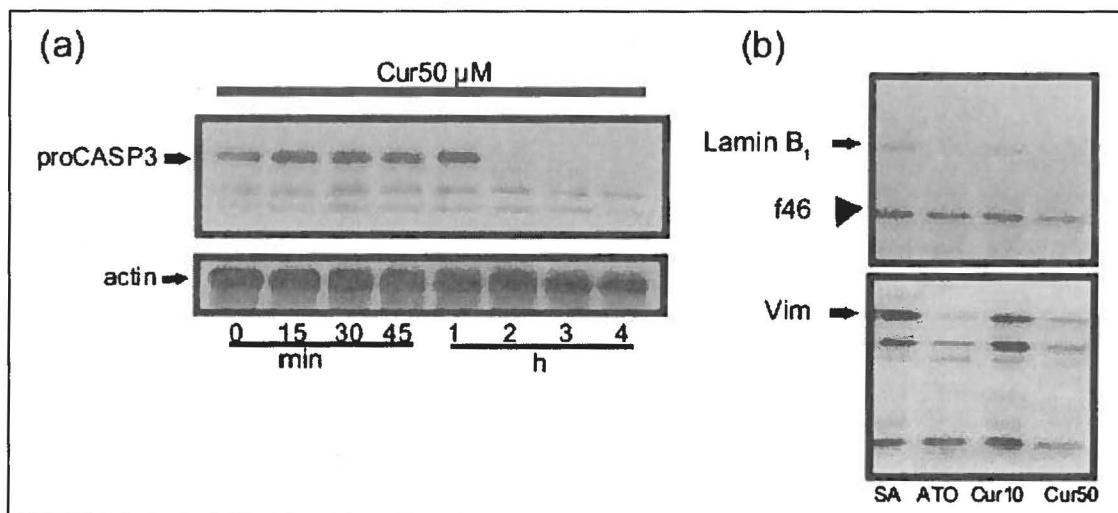


Figure 13: Curcumin induces the processing of caspase-3 and the cleavage of cytoskeletal proteins. neutrophils (10×10^6 cells/ml) were incubated for the indicated periods of time with 10 or 50 μ M curcumin (Cur10 and Cur50, respectively), and (a) the processing of procaspase-3 (proCASP3) or (b) the cleavage of lamin β 1 or vimentine (Vim) were assessed by Western blot as described in Materials and methods. Results are from one representative experiment out of at least three. Arrowhead indicates the 46-kDa fragment of lamin β 1 observed in HL-60, PLB-985 and human neutrophils (Lavastre et al., 2005). SA: spontaneous apoptosis; ATO: arsenic trioxide.

Because the atypical ER stressor ATO is known to induce *de novo* protein synthesis in neutrophils (Binet *et al.*, 2010b) and since curcumin had been found recently to induce ER stress-induced cell apoptosis in promyelocytic HL-60 cells (Pae *et al.*, 2007) we then examined whether or not curcumin could act as a more typical ER stressor, for example, by inhibiting protein synthesis, an important step known to alleviate ER stress (Boyce *et al.*, 2006, Harding *et al.*, 1999, Ron *et al.*, 2007). As illustrated in Figure 14(a), curcumin, in contrast to ATO, inhibited *de novo* protein synthesis, suggesting that curcumin acts via a different mechanism than ATO. To support this, we investigated how curcumin could alter the levels of protein ubiquitination known to be increased by ATO in neutrophils (Binet *et al.*, 2010a). As illustrated in Figure 14(b), curcumin did not increase ubiquitination of proteins in the presence or absence of the MG132 (proteasome inhibitor), and, in fact, it slightly decreased this process.

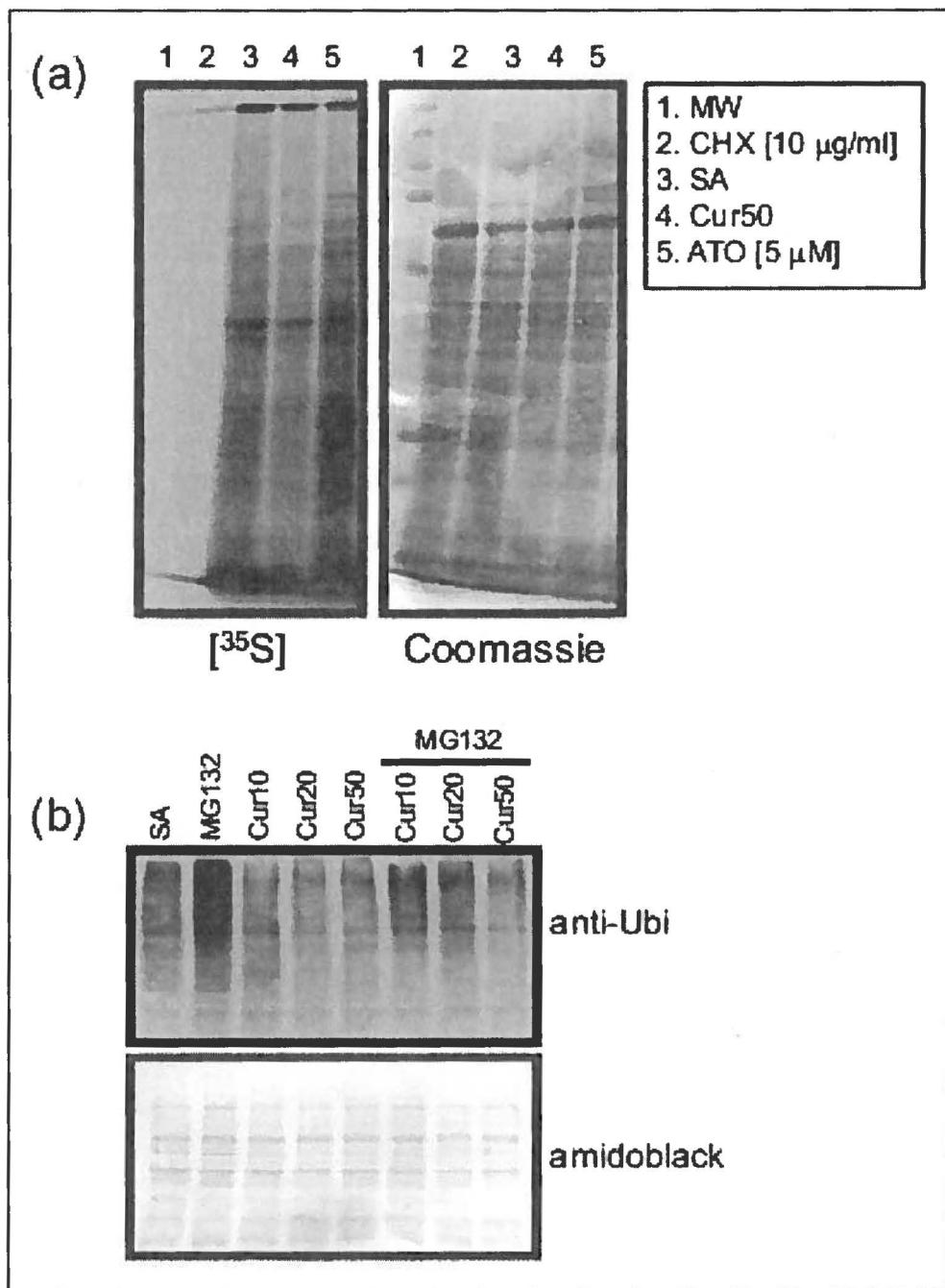


Figure 14: Curcumin inhibits *de novo* protein synthesis and protein ubiquitination in human neutrophils. Cells (10×10^6 cells/ml) were incubated for (a) 24 h or (b) 3 h with the indicated agonists and *de novo* protein synthesis (a), or ubiquitination were performed as described in Materials and methods. Results are from one representative experiment out of three. SA: spontaneous apoptosis; MW: molecular weight; ATO: arsenic trioxide; CHX: cycloheximide; MG132: proteasome inhibitor.

Activation of the ER unfolded protein response by curcumin during the apoptosis of neutrophils

The above-mentioned results prompted us to determine whether or not an ER stress occurs in response to curcumin in neutrophils by investigating the activation of the PERK/eIF2 α pathway, constituting important sensors of the ER unfolded protein response (UPR), leading to inhibition of protein synthesis. After 1 h of treatment, curcumin increased the phosphorylation of PERK but not as strongly as thapsigargin (Tp), a classical ER stressor (Figure 15(a)).

As illustrated in Figure 15(b), curcumin also activated eIF2 α , as evidence by its increased phosphorylation when compared to control (or SA). Interestingly, after 1 h, eIF2 α appeared to be more activated by curcumin than by thapsigargin, but in contrast, the effect of curcumin was not maintained over time. The above-mentioned results indicated that curcumin could activate the ER stress-induced cell apoptotic pathway in human neutrophils. Knowing that unfolded proteins are first recognized by molecular chaperones, including HSP70 and HSP90, we then decided to verify whether curcumin could decrease levels of expression of those two proteins. As expected, both HSP70 and HSP90 protein expression were decreased in response to curcumin, especially HSP90 (Figure 15(c)).

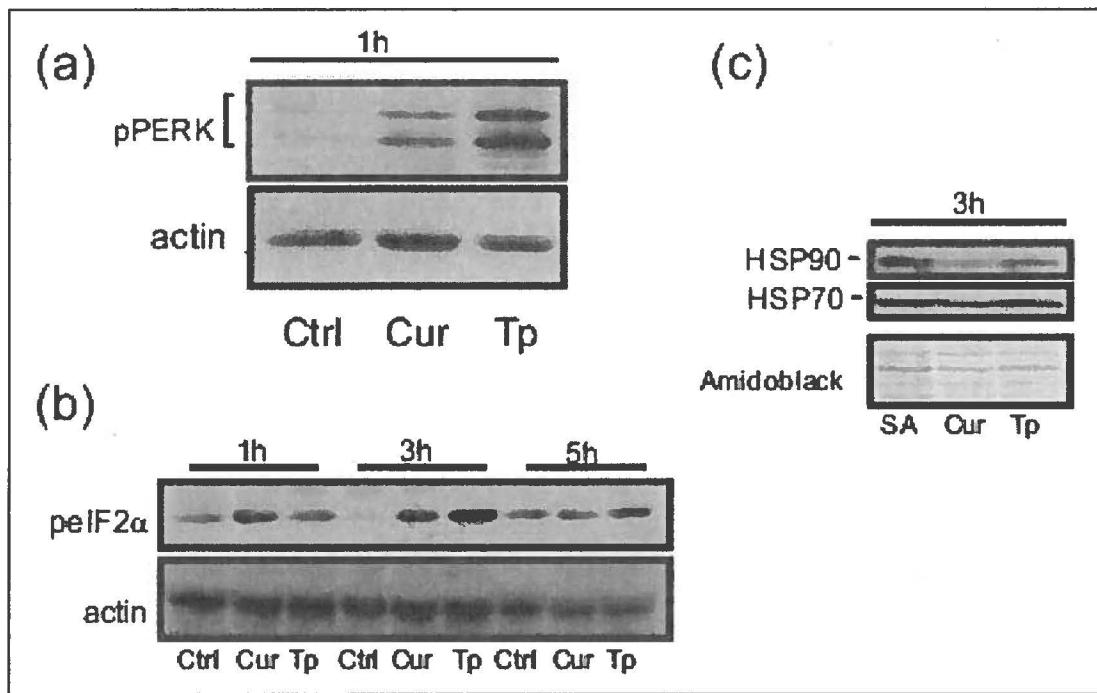


Figure 15: Curcumin activates PERK and eIF2 α but decreases the expression of HSP70 and HSP90 in neutrophils. Cells were incubated at 37°C with the diluent (1% DMSO, Ctrl or SA), 50 μ M curcumin (Cur) or 10 μ M thapsigargin (Tp) for the indicated periods of time. Activation of (a) PERK and (b) eIF2 α and (c) the expression of HSP70 and HSP90 were performed as described in Materials and methods. (a) and (b): results are from one representative experiment out of four, and (c): results are from one representative experiment out of three. SA: spontaneous apoptosis; DMSO: dimethyl sulphoxide; PERK: protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; eIF2 α : eukaryotic initiation factor 2 alpha; HSP: heat shock protein.

DISCUSSION

Accumulating evidence indicates that apoptosis of neutrophils is one of the critical determinants of the outcome of the inflammatory response. This process represents, therefore, a potential target for therapeutic intervention (Akgul *et al.*, 2001, Duffin *et al.*, 2010, Geering *et al.*, 2011). The effects of curcumin on the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways have been well described (Reuter *et al.*, 2008) but are still not fully understood, and have become more complex as novel molecular targets are discovered. Curcumin modulates numerous proapoptotic and anti-apoptotic targets, and more recently, it has been demonstrated that curcumin can act as an ER stressor in HL-60 cells (Pae *et al.*, 2007), rabbit skeletal muscle cells (Logan-Smith *et al.*, 2001) and in mouse melanoma cells (Bakhshi *et al.*, 2008). In fact, research on apoptosis and curcumin has suggested that it may induce apoptosis through all the main apoptotic pathways in cancer cells. The major apoptotic pathway targeted by curcumin may vary between cell type, differentiation state and curcumin concentration, and therefore, the precise mechanism is difficult to determine because of crosstalk between the different apoptotic pathways (Reuter *et al.*, 2008). Although the initial study (and probably the only one yet) reported that curcumin induced apoptosis in human neutrophils via p38 and caspase-3 activation, the authors did not recognize or describe the rapidity with which this molecule can act (Hu *et al.*, 2005). Here, we present new insight into the mechanisms involved in curcumin-induced apoptosis in human neutrophils. The effectiveness of curcumin on the apoptosis of neutrophils depends on the cell concentration at which the cells are plated. Although we confirmed that curcumin could effectively induced apoptosis rapidly after 6 h, the apoptotic rate did not reach more than 20% at a cell concentration of 1×10^6 cells/ml, as opposed to 60% when cells were

plated at 2×10^6 cells/ml (Hu *et al.*, 2005). The other important experimental condition that differs in this study is the temperature. The authors of the initial study kept the cells on ice before increasing the temperature, to that of the assay conditions, probably causing a thermal shock. There is no information regarding whether or not the cells were incubated in the presence or absence of serum. In this study, cells were incubated without any thermal shock, in the presence of 10% autologous serum and at a concentration of 10×10^6 cells/ml (more representative of an inflammatory response when the number of neutrophils is considerably increased). Despite this, when cells were incubated under these experimental conditions, curcumin still exerts potent proapoptotic properties, and here, we show new mechanisms related to its mode of action during the apoptosis of neutrophils. We confirmed the activation of caspase-3 in curcumin-induced neutrophils, but in addition, we show that lamin β 1 and vimentin are cleaved during curcumin-induced apoptosis, supporting the role of caspases in curcumin-induced cells (Ip *et al.*, 2011, Karmakar *et al.*, 2006, Kuo *et al.*, 2011, Wu *et al.*, 2010) including neutrophils (Hu *et al.*, 2005).

The activation of the PERK/eIF2 α pathway of the unfolded proteins suggests that unfolded proteins accumulate in the ER of curcumin-induced neutrophils. Normally, accumulation of unfolded protein in the ER forces the cell to respond by one mechanism devoted to stop protein translation, avoiding overloading of the ER by nascent proteins. Herein, as assessed by metabolic labelling and *de novo* protein synthesis, curcumin reduced, in a general manner, the translation of proteins, probably due to the resulting activation of eIF2 α , correlating with its role in attenuating protein translation (Harding *et al.*, 1999). In the ER, protein folding is achieved with the help of several molecular chaperones and folding enzymes. Among those, HSP70 and HSP90 are important

intracellular molecular chaperones with protective effects that are known to be induced in response to a variety of physiological and environmental insults (Beere, 2005, J. L. Johnson, 2012, Rothman *et al.*, 2011). The fact that curcumin decreases the expression of both HSP70 and HSP90 in human neutrophils suggests that its proapoptotic activity is related to ER stress. Interestingly, unfolded proteins are known to be rapidly degraded in cells, and one important mechanism associated with this degradation is the ubiquitin/proteasome pathway. Therefore, chaperones like HSP70 and HSP90 may recruit E3 ubiquitin ligase in order to ubiquitinate such proteins (Hutt *et al.*, 2010). However, our results show that curcumin decreased the ubiquitination of proteins in neutrophils, suggesting a role for this mechanism probably related to its proapoptotic activity.

From the data obtained in this study, it can be concluded that the proapoptotic activity of curcumin in human neutrophils is related to its ability to act as an ER stressor and to induce the ER stress-induced cell apoptotic pathway. Therefore, in addition to the results previously reported by others demonstrating that curcumin is able to induce both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells (Karmakar *et al.*, 2006) two pathways known to be activated in human neutrophils (Binet *et al.*, 2006) curcumin should be now considered as an agent able to activate the three major pathways of cell apoptosis known to be operational in human neutrophils, namely, the extrinsic, the intrinsic and the most recently identified ER stress-mediated pathways (Binet *et al.*, 2010b).

Acknowledgement

We thank Mary Gregory for reading this manuscript.

Declaration of conflicting interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

ARTICLE 2

Curcumin inhibits agent-induced human neutrophils functions *in vitro* and lipopolysaccharide-induced neutrophilic infiltration *in vivo*.

La curcumine inhibe les fonctions inflammatoires des neutrophiles *in vitro* et l'infiltration leucocytaire *in vivo*.

Francis Antoine¹, Jean-Christophe Simard¹ et Denis Girard¹

¹ Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Qc, Canada.

Contribution : À titre de premier auteur, j'ai réalisé toutes les expériences à l'exception de celles relatives à l'activation du facteur de transcription NF-κB (EMSA et ELISA) pour lesquelles j'ai été aidé par Jean-Christophe Simard. J'ai participé à la rédaction de toutes les sections. Jean-Christophe Simard a participé à la rédaction des sections intitulées *Preparation of nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay* et *transFactor p50 Nf-κB ELISA kit*.

L'article est présenté tel qu'accepté pour publication dans International Immunopharmacology le 30 septembre 2013. Le numéro des figures a été modifié pour assurer un décompte continu des figures dans la thèse.

RÉSUMÉ

La curcumine est une molécule connue pour posséder des propriétés anti-inflammatoires. Malgré le fait que les neutrophiles sont des cellules importantes en inflammation, le rôle du curcumin sur la physiologie des neutrophiles n'est pas encore bien documenté. Ici, nous démontrons que la curcumine inhibe la suppression de l'apoptose induite par le formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) et le lipopolysaccharide (LPS). En addition, la curcumine renverse la production des réactifs oxygénés induite par le phorbol-myristate-acetate (PMA) tel qu'évalué par cytométrie en flux en utilisant la sonde fluorescente CM-H₂DCF-DA. En utilisant une approche de microréseaux d'anticorps nous avons trouvé que la curcumine inhibe la production de cytokines induite par le LPS, incluant MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IL-8 (CXCL-8) et GRO- α . L'effet inhibiteur de la curcumine sur la production d'IL-8 a été confirmé par ELISA. Nous avons démontré que la curcumine inhibe l'activation du facteur de transcription NF- κ B induite par le LPS. En utilisant le modèle inflammatoire murin de la poche d'air, nous avons démontré que la curcumine (intra péritonéale) inhibe l'infiltration leucocytaire (neutrophiles) induite par le LPS. Tel que démontré par l'approche de microréseaux d'anticorps murins, la curcumine module la production locale de cytokines et de chimiokines incluant, mais ne se limitant pas à, MIP-1 α et MIP-1 β . En conclusion, la curcumine possède des propriétés modulatoires sur la physiologie et l'activation des neutrophiles *in vitro*, ainsi que d'importants effets anti-inflammatoires *in vivo* en inhibant l'infiltration leucocytaire induite par le LPS.

Mots clés : Curcumine, neutrophiles, modulation immunitaire, inflammation

ABSTRACT

Curcumin is known to possess anti-inflammatory activities. Despite the fact that neutrophils are key player cells in inflammation, the role of curcumin on neutrophils cell biology is not well documented. In addition, the effect of curcumin on agent-induced neutrophilic inflammation is not well documented. Here, we demonstrated that curcumin inhibited formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)- or lipopolysaccharide (LPS)-induced suppression of human neutrophils apoptosis. In addition, we found that curcumin reversed the ability of phorbol myristate acetate (PMA) to induce reactive oxygen species as assessed by flow cytometry using the CM-H₂DCF-DA probe. Using an antibody array approach, curcumin was found to inhibit LPS-induced cytokine production, including MIP-1 α , MIP-1 β , IL-6, IL-8 (CXCL-8) and GRO- α . The inhibitory effect of curcumin on IL-8 production was confirmed by ELISA. Using both an electrophoretic mobility shift assay and a transFactor p50 NF- κ B ELISA, we demonstrated that curcumin inhibited LPS-induced NF- κ B activation. *In vivo*, using the murine air pouch model of acute inflammation, we demonstrated that intraperitoneal administration of curcumin inhibited LPS-induced neutrophilic infiltration. As assessed by a murine antibody array approach, curcumin was found to decrease the local production of several cytokines/chemokines induced by LPS, including, but not limited to, MIP-1 α and MIP-1 β . We conclude that curcumin possesses potent modulatory activities on primed or agent-induced human neutrophils *in vitro* and that it possesses important anti-inflammatory activities *in vivo* by inhibiting LPS-induced neutrophilic inflammation.

Keywords: Curcumin, neutrophils, immunomodulation, inflammation

INTRODUCTION

Neutrophils are the most abundant leukocyte cells in human blood. They are phagocytes known to undergo spontaneous apoptosis in physiological condition in order to maintain homeostasis. The neutrophils-mediated inflammatory response is regarded as a multi-step process involving the initial adhesion of circulating neutrophils to the activated vascular endothelium, the subsequent extravasation and migration of neutrophils towards the inflammatory foci, and the ultimate *in situ* elimination of foreign microorganisms through phagocytosis, generation of reactive oxygen species (ROS), and release of microbicidal substances (Faurschou *et al.*, 2003). Neutrophils and their arsenal mainly contribute to the inflammatory response and, therefore, important regulatory mechanisms that allow limitation and resolution of inflammation must exist (Hallett *et al.*, 2008). Apoptosis, a programmed cell death, is one mechanism that occurs in neutrophils to prevent the uncontrolled release of their toxic molecules they synthesize or release by degranulation. For example, ROS production is known to be involved in the induction of apoptosis in neutrophils (Simon *et al.*, 2000). The apoptotic rate of neutrophils during an infection can be reduced and thus may contributes to enhance acute and chronic inflammation (Fox *et al.*, 2010) damaging host tissues and causing immune diseases. The role of neutrophils in the regulation of inflammation has long been under estimated. However, recent studies have shown that neutrophils have a more important and active role than was previously believed in sustaining or resolving chronic inflammation (Filep *et al.*, 2009).

Curcumin is a yellow polyphenolic compound, extracted from the rhizome of *Curcuma longa*, exhibiting multiple biological activities. Curcumin has been found to have potent

immunomodulatory activities in multiple autoimmune and inflammatory diseases (Bright, 2007, Gautam *et al.*, 2007). Recently, curcumin has been found to induce apoptosis in neutrophils, but the mechanism is not well defined (Hu *et al.*, 2005). Identification of new molecules that regulate several functions of neutrophils may lead to the development of new therapeutic strategies to treat inflammatory diseases. Recent studies indicate that curcumin can ameliorate multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis and inflammatory bowel disease in animal models and in human (Bright, 2007, Gautam *et al.*, 2007). Curcumin inhibits such autoimmune diseases by different mechanisms, including the regulation of inflammatory cytokines and associated signalling pathways in immune cells (Jagetia *et al.*, 2007). For several decades, much research has been performed regarding the immunomodulatory properties of curcumin, but only a limited number of reports have studied the interaction of curcumin with human neutrophils. Although curcumin has previously been found to induce apoptosis in human neutrophils (Hu *et al.*, 2005) its ability to alter the anti-apoptotic activity of other molecules has never been addressed. In the present study, we have investigated the anti-inflammatory effects of curcumin on primed human neutrophils *in vitro* and have established that this compound inhibits LPS-induced neutrophils infiltration *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Otherwise specified, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Based on prior experiments, curcumin was used at 50 µM throughout this study.

Isolation of human neutrophils

Neutrophils were isolated from venous blood of healthy volunteers by dextran sedimentation, followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Inc., QC, Canada) as previously described (Antoine *et al.*, 2010). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion and was consistently over 99%. Cell purity (>97%) was verified by cytology from cytocentrifuged preparations colored by Hema Stain 3 (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Neutrophils were then resuspended in RPMI 1640 HEPES (25 mM) with penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 µg/ml) (p/s) for the experiments.

Assessment of the apoptosis of neutrophils by cytology

Briefly, freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI 1640 HEPES p/s supplemented with 10% autologous serum) were incubated with the indicated agonists for 24 h in the presence or absence of curcumin. Cytocentrifuged preparations of neutrophils were performed with a Cytotek centrifuge (Miles Scientific, Elkart, IN), as

previously described (Antoine *et al.*, 2010) and were stained with Hema Stain 3 (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Cells were examined by light microscopy at a final 400 X magnification and apoptotic neutrophils were defined as cells containing one or more characteristically dark-stained pyknotic nuclei. Results are expressed as percentage of cells in apoptosis.

Production of reactive oxygen species

The cells were washed and resuspended in HBSS, containing 5 µM of CM-H₂DCF-DA (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), at a cell density of 10 x 10⁶ cells/ml for 30 min at 37°C. Cells were treated with buffer (HBSS 1% DMSO, Control), PMA, curcumin or a mixture of curcumin and PMA for 30 min. The shift of fluorescence in the FL1 channel was recorded using a FACScan (BD Biosciences). Results are expressed as Gmean of the shift in fluorescence.

Proteome profiler™ array

The human cytokine array panel A was purchased from R&D Systems Inc (Minneapolis, MN, USA). All the steps for the detection of 36 different analytes were performed following the manufacturer's recommendation. Pooled supernatants (n = 8) harvested from neutrophils (10 x 10⁶ cells/ml in RPMI 1640 HEPES p/s supplemented with 10% autologous serum) treated during 6 h with buffer (HBSS 1% DMSO, Control), or 1 µg/ml LPS with or without 50 µM curcumin were used to probe the membranes. The chemiluminescent signal from the bound cytokines/chemokines present in the supernatants was detected on Kodak X-OMAT-RA film. The signal intensity of each analyte (in duplicate) was normalized to the membrane's positive controls. Protein array

membranes were scanned and densitometric analysis was performed using the AlphaEase FC (FluorChem HD2) software.

CXCL-8 (IL-8) production

The measurement of IL-8 was determined with commercially available enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) kit (Invitrogen). Neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI 1640 HEPES p/s supplemented with 10% autologous serum) were incubated for 6 h with buffer (HBSS 1% DMSO, Control), 50 μ M curcumin, 1 μ g/ml LPS or curcumin + LPS in a 96-well plate. Supernatants were harvested after centrifugation and stored at -80°C before performing ELISA.

Preparation of nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay

Nuclear extracts were prepared using the NucBuster protein extraction kit from Novagen and Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) reaction was done with Gel Shift Assay System from Promega, as previously published (Binet *et al.*, 2011). Neutrophils were treated for 6 h with buffer (HBSS 1% DMSO, Control), or 1 μ g/ml LPS with or without 50 μ M curcumin, followed by extraction of nuclear proteins. Briefly, a volume corresponding to 9 μ g of nuclear proteins was mixed with 1.75 pmol of unlabeled NF- κ B consensus oligonucleotides (Promega #E3292; competitive) or unlabeled AP2 consensus oligonucleotides (Promega #E3212; non-competitive) for 15 min at room temperature, in a final volume of 10 μ l. Then, 0.03 pmol of [32 P]-labelled NF- κ B consensus oligonucleotides, prepared following the manufacturer's recommendations, were added to these mixtures for 30 min at room temperature. Electrophoresis of the DNA-protein

complexes was performed using 4% polyacrylamide non-denaturating gels. The gels were dried, exposed at -80°C for 24 h and visualized using Kodak X-OMAT-RA films.

TransFactor p50 NF-κB ELISA

The TransFactor p50 NF-κB ELISA was done according to the Colorimetric TransFactor ELISA procedure in the user manual (PT3494-1) from Clontech Laboratories (Mountain View, CA, USA). Nuclear extracts obtained using the NucBuster protein extraction kit after 6 h of treatment with buffer (HBSS 1% DMSO, Control), or 1 µg/ml LPS with or without 50 µM curcumin were used for the assays. Briefly, 10 µg of nuclear proteins were incubated within wells for 60 min at room temperature. Diluted primary antibody (1:1,000) was then added to each wells and incubated for 60 min at room temperature. Wells were then washed 4 times with 150 µl of 1 X TransFactor Buffer. Then, 100 µl of TMB substrate was added to each well for 10 min. The absorbance of the plate was read at 655 nm using a SpectraMax M5 spectrophotometer from Molecular Devices.

Murine Air pouch model

CD-1 female mice (6-8 weeks of aged) were obtained from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). On days 0 and 3, mice were anaesthetized with isoflurane and 3 ml of sterile air was injected subcutaneously, in the back, with a 26-gauge needle to form an air pouch, as published previously (Goncalves *et al.*, 2011). On day 6, 1 ml of buffer (HBSS 1% DMSO, Control), 1 µg/ml LPS with or without 50 µM curcumin was injected into air pouches for 6 h. After the treatments, mice were killed by CO₂ asphyxiation and the pouches were washed once with 1 ml (to harvest supernatants)

and then twice with 2 ml of HBSS containing 10 mM EDTA. Exudates were centrifuged at 100g for 10 min at room temperature and supernatants (centrifuged at 4°C) were collected and stored at -80°C for further analysis. Cells from the exudates were pooled and resuspended in 1 ml to determine the cell concentration. Then, cell suspensions were adjusted at 0.5×10^6 cells/ml, spread onto microscope slides and stained with Hema Stain 3 (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) for identification/quantification of leukocyte cell subpopulations. In other experiments, 1 ml of buffer (HBSS 1% DMSO, Control) or 50 μ M curcumin was injected intraperitoneally (i.p.) 30 min before administration of 1 ml of buffer (HBSS 1% DMSO, Control) or LPS (1 μ g/ml) in the pouches for 6 h. All experiments were performed as per protocols approved by Animal Use and Care Committee at INRS-Institut Armand-Frappier.

Statistical analysis

The data are reported as mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA, and differences between tested groups and control were assessed using the Dunnett's Multiple Comparison Test with GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was established at $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of curcumin on fMLP- and LPS-induced suppression of apoptosis

As illustrated in Figure 16, neutrophils undergoing spontaneous apoptosis (SA) after 24 h represent, as expected, $46 \pm 4.7\%$ (mean \pm SEM, n = 4) of the total cell population as evidenced by the proportion of the cells having characteristic pyknotic nuclei (Antoine *et al.*, 2010, Lavastre *et al.*, 2002). The proapoptotic activity of curcumin (50 μ M) was confirmed as $75.4 \pm 2.9\%$ of the cells were in apoptosis. In neutrophils treated with 0.1 μ M fMLP or with 1 μ g/ml LPS, the apoptotic rate was decreased to attain $20.2 \pm 3.2\%$ and $14.2 \pm 3.9\%$, respectively. In parallel, we observed that curcumin reverse the antiapoptotic activity of both fMLP and LPS to $70.4 \pm 8.4\%$ and $43.2 \pm 9\%$, respectively, after 24 h. These results indicate that curcumin is a potent proapoptotic agent that could preserve its activity even in the presence of fMLP or LPS.

Effect of curcumin on the production of reactive oxygen species

As illustrated in Figure 17, PMA induced a potent ROS production, as reflected by the high value of the Gmean of fluorescence of 940.5 ± 255.3 (mean \pm SEM, n = 4). Curcumin decreased, but not significantly, such production (22.1 ± 4.7) vs control cells (48.5 ± 14.1). However, curcumin almost completely abrogated the PMA-induced ROS production when cells were treated with both agents as evidenced by a value close to that of the control cells (50.6 ± 10.7).

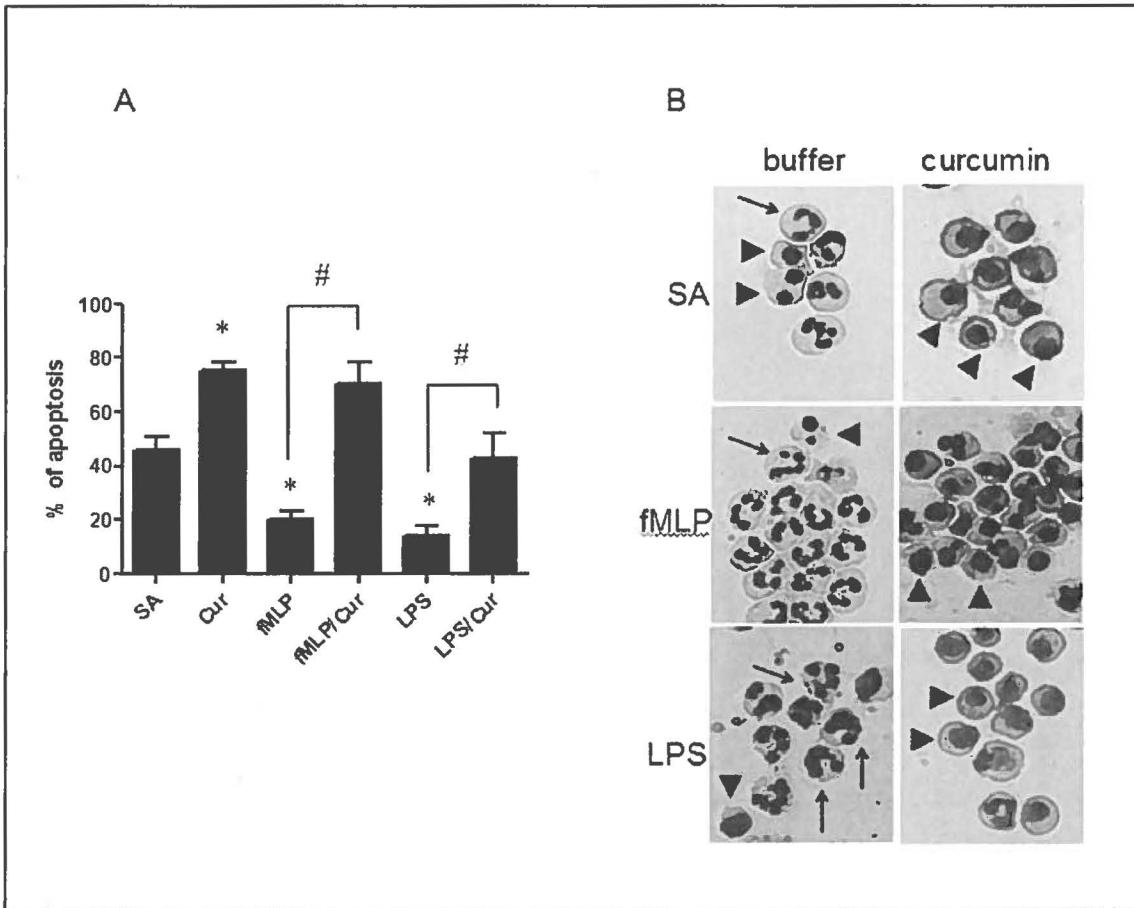


Figure 16: Curcumin inhibits the capacity of fMLP and LPS to delay human neutrophils apoptosis. Freshly isolated human neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI 1640 HEPES p/s supplemented with 10% autologous serum) were incubated in the presence of buffer (spontaneous apoptosis or SA), 50 μ M curcumin (Cur), fMLP (0.1 μ M), LPS (1 μ g/ml) or a combination of fMLP or LPS with curcumin (fMLP + Cur or LPS + Cur). Apoptosis was determined by cytology as described in Materials and methods. Panel A: results are means \pm SEM (n = 4); * p < 0.05 vs SA; # p > 0.05 vs corresponding group. Panel B: Typical images obtained illustrating non apoptotic (arrows) and apoptotic neutrophils (arrowheads).

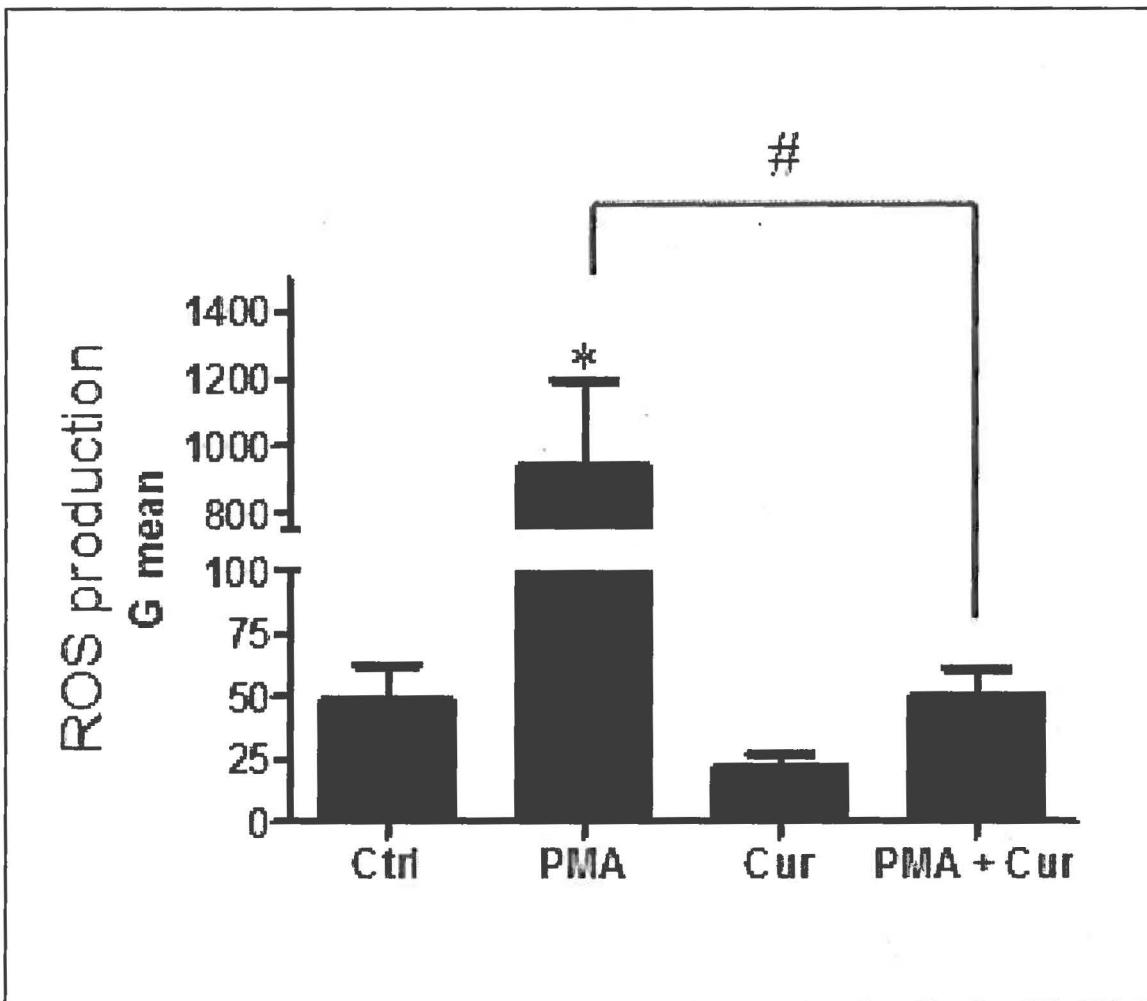


Figure 17: Curcumin inhibits PMA-induced ROS production in human neutrophils. Neutrophils (10×10^6 cells/ml in HBSS) were stained with the CM-H₂DCF-DA probe and then treated with buffer (HBSS 1% DMSO, Ctrl), PMA (1 nM), 50 μ M curcumin (Cur) or a mixture of PMA and Cur, for 30 min and the shift in fluorescence was analyzed by flow cytometry as described in Materials and methods. Results are means \pm SEM (n = 4), * p < 0.05 vs Ctrl; # p < 0.05 vs corresponding group.

Effect of curcumin on the secretion of cytokines and chemokines from human neutrophils

It is well known that curcumin can modulate the expression of inflammatory cytokines in immune cells (Jagetia *et al.*, 2007). We thus investigated the effect of curcumin on the secretion of cytokines and chemokines by neutrophils using an antibody array approach as previously documented (Goncalves *et al.*, 2010, Goncalves *et al.*, 2011). Figure 18 shows the profiles of the different analytes secreted by neutrophils after 6 h of treatment with buffer (HBSS 1% DMSO, Control), 50 µM curcumin, 1 µg/ml LPS, or both curcumin + LPS. The supernatants from different donors ($n = 8$) have been pooled to probe the membranes. The densitometry analysis of the secretion of cytokines and chemokines has been compared between treatments and integrated as fold of increase. As illustrated, LPS induced a secretion of cytokines and chemokines that is affected by curcumin. More importantly, curcumin was able to abrogate the secretion of IL-6, MIP-1 α and MIP-1 β induced by LPS. Also, curcumin was able to reduce the secretion of IL-8 induced by LPS, despite its capacity to slightly induce the secretion of IL-8 by itself (Figure 18).

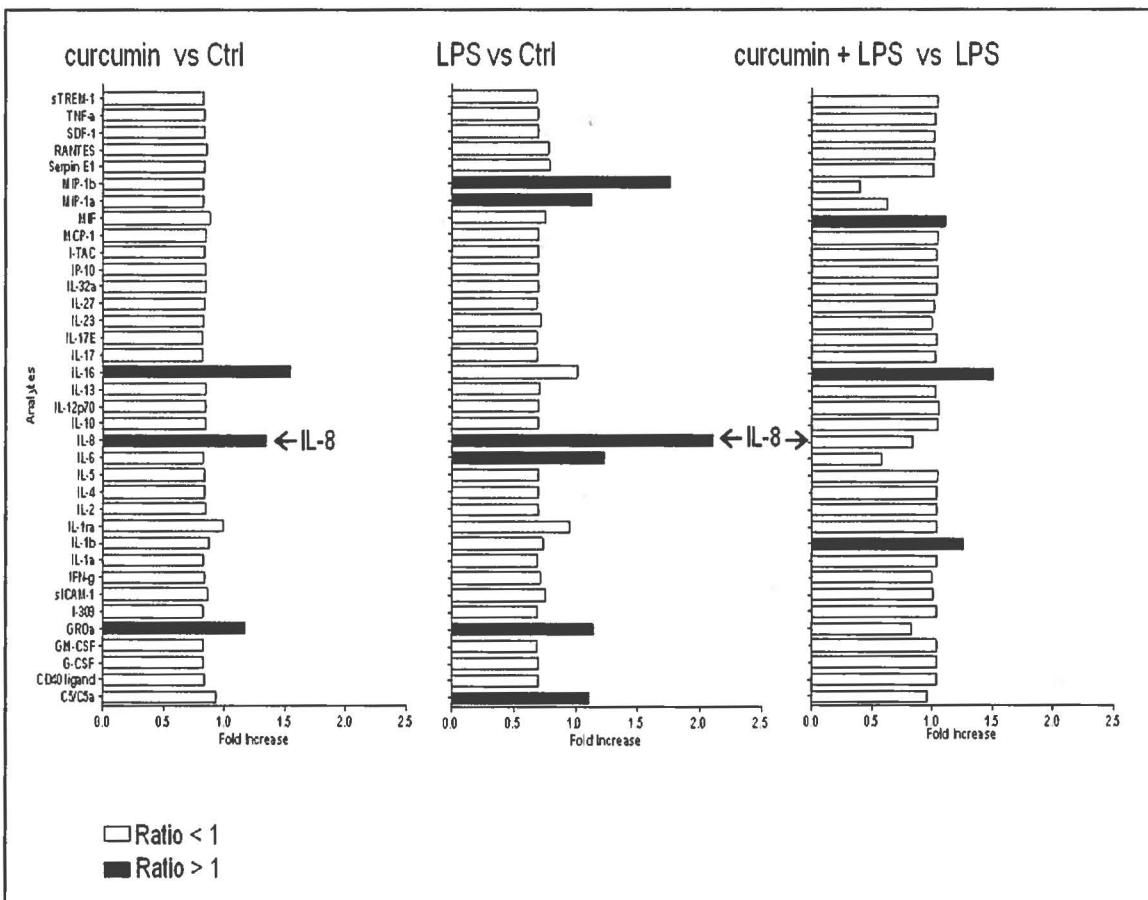


Figure 18: Curcumin inhibits the ability of LPS to increase cytokines production in human neutrophils. Cells (10×10^6 cells /ml in RPMI 1640 HEPES p/s supplemented with 10% autologous serum) were incubated for 6 h in the presence of buffer (HBSS 1% DMSO, Ctrl), 50 μ M curcumin, 1 μ g/ml LPS, or a mixture of curcumin + LPS. The supernatants used to probe the membranes were obtained from 8 different donors as described in Materials and methods. Results are expressed as ratio for each analyte. White bars: ratio < 1. Black bars: ratio > 1. Note that curcumin decreased the production of several analytes induced by LPS and that IL-8 is the predominant analyte produced in response to LPS. Legend (from top to bottom): sTREM-1, TNF- α , SDF-1, RANTES, Serpin E1, MIP-1 β , MIP-1 α , MIF, MCP-1, I-TAC, IP-10, IL32a, IL-27, IL-23, IL-17E, IL-17, IL-16, IL-13, IL-12p70, IL-10, IL-8, IL-6, IL-5, IL-4, IL-2, IL-1ra, IL-1 β , IL-1 α , IFN- γ , sICAM-1, I-309, GRO α , GM-CSF, CD40 ligand, C5/C5a.

To support the data obtained by the antibody array approach, we then quantified the production of IL-8 by ELISA. Again, as illustrated in Figure 19, curcumin slightly, but significantly, increased the production of IL-8 by itself ($n = 5$) but markedly inhibited LPS-induced IL-8 production. These results concord very well with those obtained by pooling supernatants used for the antibody array assay (Figure 18).

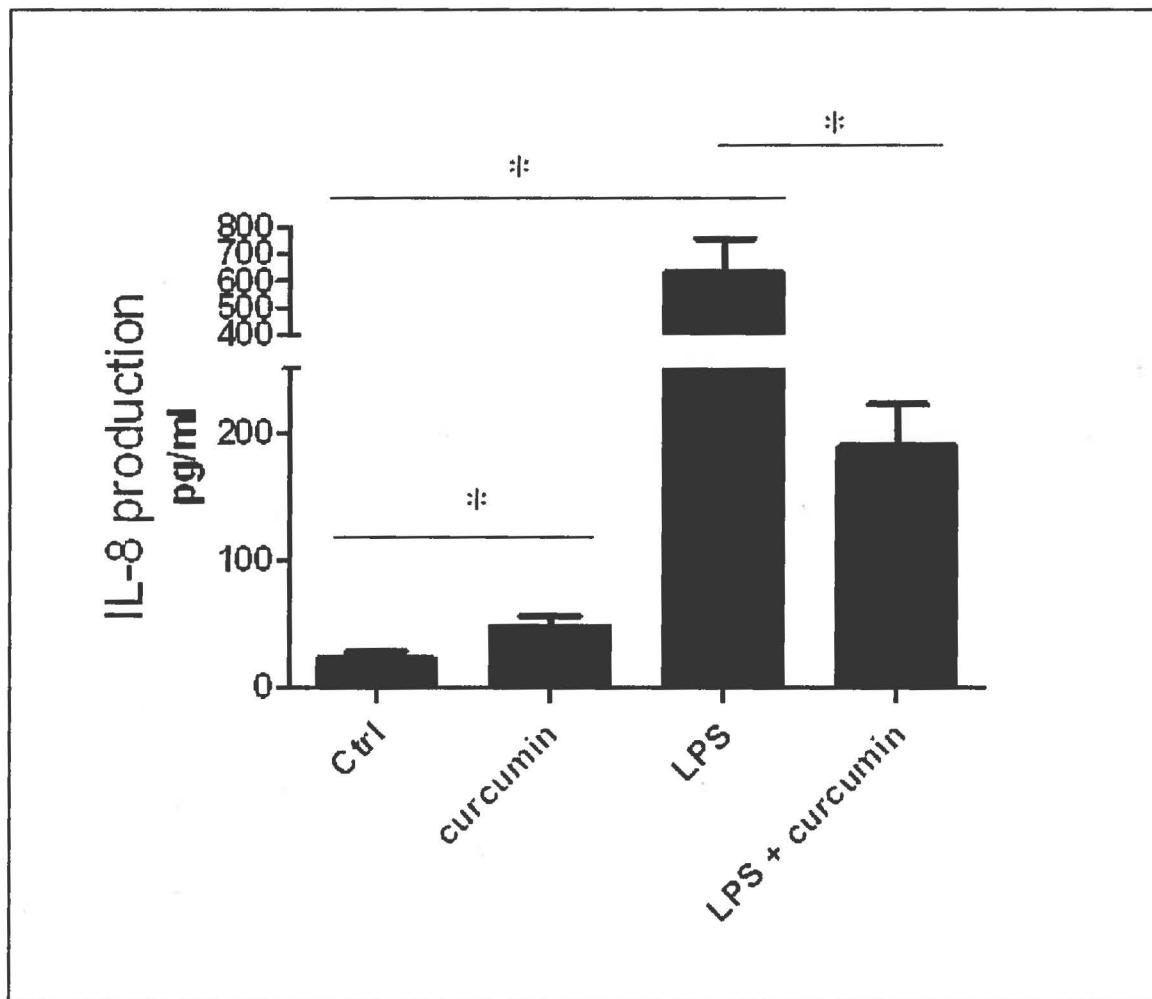


Figure 19: Curcumin is an inhibitor of LPS-induced IL-8 production. Supernatants from Five randomly selected blood donors used for the experiments in Figure 3 were used to quantify IL-8 production by ELISA as described in Materials and methods. Results are means \pm SEM ($n = 5$). * $p < 0.05$ vs corresponding group.

Curcumin inhibits the LPS-induced activation of NF-κB in human neutrophils

Given the ability of curcumin to affect the secretion of cytokines and chemokines by neutrophils, we next decided to evaluate the role of curcumin on the activation of the transcription factor NF-κB. NF-κB is known to be involved in cytokine and chemokine production, including IL-8, in human neutrophils. Moreover, NF-κB is known to be a molecular target of curcumin (Berger *et al.*, 2012, Zhou *et al.*, 2011). We evaluated the activation of NF-κB by two methods. As illustrated in Figure 20A, LPS increased the NF-κB DNA binding activity when compared to untreated cells and this effect was reversed by curcumin as determined by EMSA. Using an NF-κB p50 TransFactor ELISA kit allowing direct measurement of the p50 subunit in the nucleus, we confirmed the previous EMSA data (Figure 20B). Thus, the results of these two approaches indicate that curcumin possesses the capacity to inhibit LPS-induced activation of NF-κB in human neutrophils.

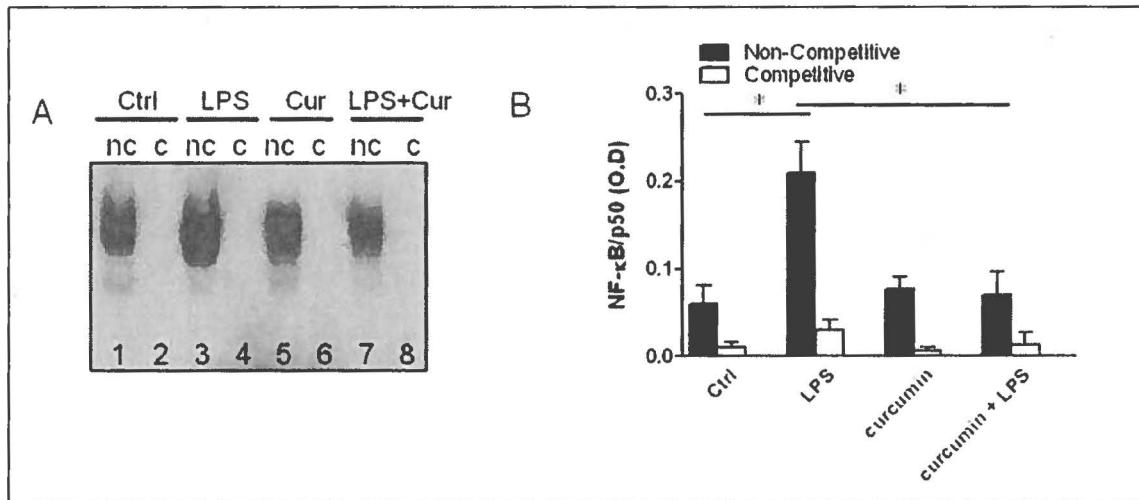


Figure 20: Evidence that curcumin is an inhibitor of the transcription factor NF-κB activity induced by LPS in human neutrophils. Neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI 1640 HEPES p/s supplemented with 10% autologous serum) were treated during 6 h with buffer (HBSS 1% DMSO, Ctrl) or 1 μ g/ml LPS in the presence or absence of 50 μ M curcumin (Cur) and then the nuclear extracts were prepared in order to perform EMSA and the TransFactor p50 NF-κB ELISA as described in Materials and methods. Panel A: nc: non-competitive; c: competitive. Panel B: results are means \pm SEM ($n = 4$). * $p < 0.05$ vs corresponding group.

Curcumin inhibits LPS-induced neutrophils influx in vivo

Because the above results support anti-inflammatory activity of curcumin and that this latter is able to reverse LPS-induced suppression of neutrophils apoptosis and cytokine production, we decided to study the potential anti-inflammatory activity of curcumin in LPS-induced neutrophils inflammation *in vivo*. To do so, we used the well-established model of LPS-induced neutrophilic infiltration in murine air pouch (Goncalves *et al.*, 2011, Lavastre *et al.*, 2004, Pelletier *et al.*, 2001). To determine whether or not curcumin abrogate inflammation and because curcumin is not a stable molecule having a shorter half-life in phosphate buffer or serum-free cell culture medium (Metzler *et al.*, 2013) we administered curcumin by i.p. route 30 min before injecting LPS in the pouch for 6 h and measured inflammation. As illustrated in Figure 21A, pre-treatment with curcumin

inhibited nearly 50% of the effect of LPS where the number of total leukocytes significantly decreased from $6.1 \pm 1.2 \times 10^6$ cells/pouch (mean \pm SEM, n = 9) to $3.3 \pm 0.5 \times 10^6$ cells/pouch (n = 11). Again, and as expected, more than ~90% of leukocytes were neutrophils as determined by cytology (Figure 21B).

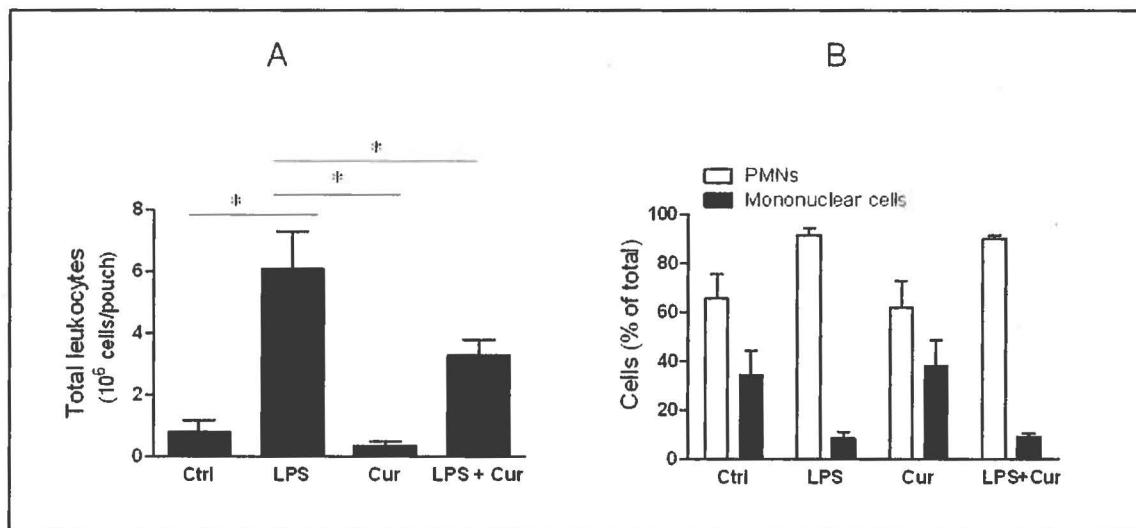


Figure 21: Curcumin inhibits LPS-induced neutrophilic inflammation *in vivo*. Air pouches were created (day 0 to 6) and 1 ml of 50 μ M curcumin (Cur) or buffer (HBSS 1% DMSO, Ctrl) was administered intraperitoneally 30 min prior injection of LPS (1 μ g/ml) into pouches and the exudates were harvested 6 h later and the number and identification of leukocytes were determined by cytology as described in *Materials and methods*. Panel A: total leukocytes are expressed as means \pm SEM (n \geq 5). * p < 0.05 vs corresponding group. Panel B: Identification of leukocytes revealed that, as expected, the majority of the cells were neutrophils.

Curcumin downregulates the local production of several cytokines and chemokines induced by LPS in vivo

Exudates from the above experiments were harvested and a murine antibody array approach was used to detect the local production of cytokines and chemokines. As illustrated in Figure 22, pre-treatment with curcumin decreased the production of several

analytes induced by LPS (grey vs black bars). These include especially chemokines such as BLC, MIP-1 α , MIP-1 β and MIP-2.

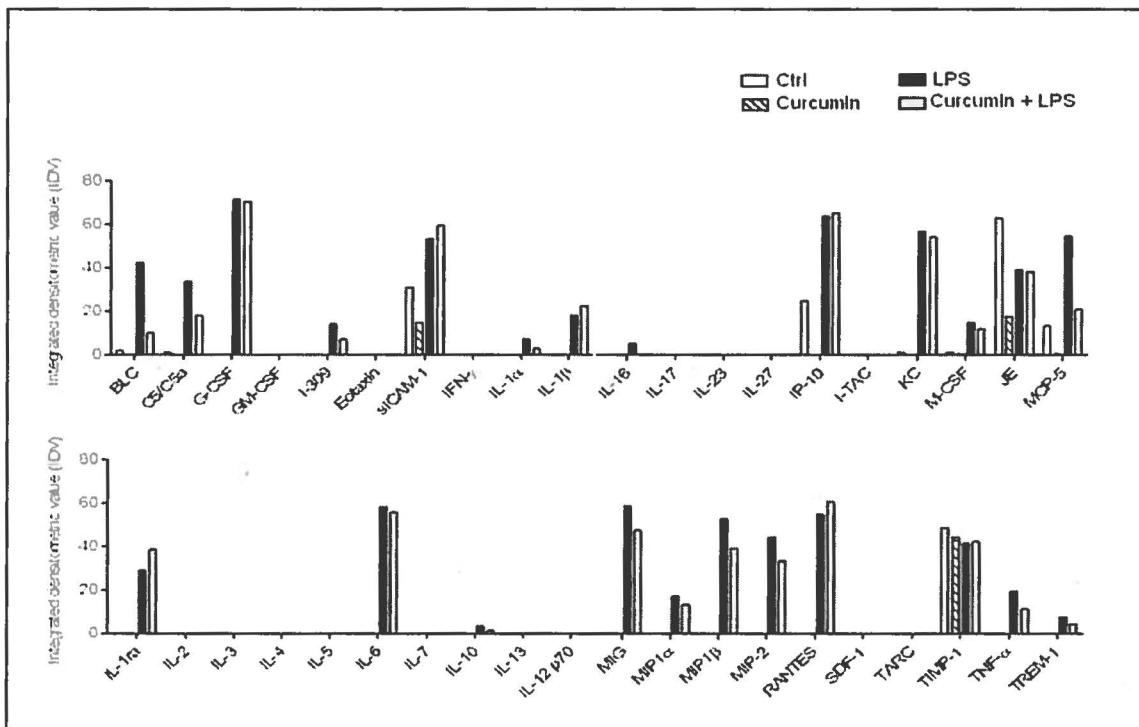


Figure 22: Curcumin decreases the LPS-induced local production of cytokines *in vivo*. The exudates from the same mice used in Figure 6 were used for detection of 40 different analytes by an antibody array assay as described in Materials and methods. All the different analytes are illustrated on the axis (20 in each row). Note that curcumin decrease the LPS-induced production of some analytes (see grey vs black bars).

DISCUSSION

This study determined that curcumin possesses inhibitory activity in agent-induced human neutrophils functions *in vitro*, including apoptosis, ROS production, cytokines secretion and NF- κ B activation. In addition, we show here that curcumin possesses anti-inflammatory activity *in vivo* using the murine air pouch model. The ability of curcumin to inhibit the suppression of neutrophils apoptosis induced by LPS is not unique to LPS since it also suppressed the antiapoptotic effect of fMLP. This indicates that curcumin may possess a large spectrum of activity on different anti-apoptotic agents in neutrophils. Of note, the proapoptotic activity of curcumin is not unique to neutrophils since this compound is known to induce apoptosis in a variety of cancer cells (Zhou *et al.*, 2011). Knowing the importance of eliminating apoptotic neutrophils by professional phagocytes for the resolution of inflammation (Akgul *et al.*, 2001, Duffin *et al.*, 2010, Filep *et al.*, 2009), the direct proapoptotic ability of curcumin previously reported in neutrophils (Hu *et al.*, 2005) in addition to the fact that curcumin also reversed anti-apoptotic activities of potent neutrophils agonists (this report), fits well with its anti-inflammatory activity. Moreover, this latter property of curcumin helps in explaining why this old spice possesses such a large spectrum of anti-inflammatory activities (Aggarwal *et al.*, 2009). In addition, the capacity of curcumin for inhibiting pro-inflammatory cytokines and chemokines normally increased by LPS, has also to be considered for better understanding of its general mode of action in neutrophils. MIP-1 β , and to a lesser extent, MIP-1 α , appear to be the central chemokines which production induced by LPS is inhibited by curcumin in human neutrophils. Our results are in agreement with another study reporting that the production of MIP-1 α induced by LPS in murine macrophages and in immortalized mouse colonic epithelial cells (YAMC) is inhibited by curcumin

(Larmonier *et al.*, 2011). Unfortunately, the authors did not study MIP-1 β production, which is here the most potent chemokine induced by LPS in human neutrophils. However, another study reported that curcumin abrogated amyloid peptide-induced expression of TNF- α and IL-1 β cytokines as well as the chemokines MIP-1 β , MCP-1 and IL-8 in both human peripheral blood monocytes and THP-1 cells (Giri *et al.*, 2004). Therefore, our results also agree with these observations performed in other cells of myeloid origin. In another study, the capacity of curcumin to inhibit PMA- and LPS-induced human monocytes and murine alveolar macrophages production of IL-8, MIP-1, MIP-1 α , IL-1 β and TNF- α was also previously reported (Abe *et al.*, 1999). In addition to MIP-1 α and MIP-1 β , curcumin was also able to inhibit LPS-induced production of IL-6 and GRO- α . Overproduction of IL-6 is known to be associated with inflammation while GRO- α is not only a potent chemoattractant for neutrophils but is also a potent activator of these cells by modulating several functions, including shape change, intracellular free calcium levels, exocytosis, and the respiratory burst in neutrophils (Bechara *et al.*, 2007, Geiser *et al.*, 1993). Intriguingly, we are the first to report that curcumin increased the production of some analytes by itself, such as IL-8, IL-16, and GRO- α . Whether this is particular to human neutrophils is not clear. The production of IL-16 by these cells is a recent discovery and its role in the neutrophils biology is unknown. IL-16 is defined as a pleiotropic pro-inflammatory cytokine with chemotactic activity (Center *et al.*, 1997). In human, Katano *et al.* reported that S100A8 induced the production of IL-16 by neutrophils, as assessed by an antibody array assay (the same as we used here) and by ELISA (Katano *et al.*, 2011). They also demonstrated that the production of IL-16 was even more pronounced when neutrophils were co-stimulated with GM-CSF. To the best of our knowledge, the increased production of IL-8 in curcumin-induced neutrophils has never been reported. Knowing the reputed anti-inflammatory activities of curcumin, it is

unexpected that this compound would increase the production of IL-8, one of the most potent human neutrophils activator well-known for its chemotactic and pro-inflammatory activities. However, IL-8 is also known to possess some anti-inflammatory activities, since it inhibits adhesion of leukocytes on activated endothelial cells. Also, neutrophils undergoing phagocytosis are known to release important quantity of IL-8 (Bazzoni *et al.*, 1991). Preliminary experiments performed in our laboratory indicate that curcumin enhances phagocytosis of opsonised sheep red blood cells by human neutrophils (unpublished data), suggesting that curcumin can also activate some neutrophils functions by itself. IL-8 was previously found to be located in human neutrophils organelle distinct from the classical granules and secretory vesicles (Pellme *et al.*, 2006). We propose that curcumin, a potent NF-κB inhibitor (Berger *et al.*, 2012, Zhou *et al.*, 2011) increases the secretion of IL-8 probably already stored in the reported organelles by an NF-κB-independent mechanism and that it inhibits LPS-induced IL-8 production known to be largely dependent upon NF-κB activation (Lakshmanan *et al.*, 2007) but this remains to be determined. However, our results demonstrating that curcumin inhibits NF-κB in human neutrophils are also in accordance with other studies that have previously shown an inhibition of NF-κB translocation by curcumin in three different rhabdomyosarcoma cell lines (Berger *et al.*, 2012).

However, our results demonstrating that curcumin inhibits NF-κB in human neutrophils are also in accordance with other studies that have previously shown an inhibition of NF-κB translocation by curcumin in three different rhabdomyosarcoma cell lines (Shehzad *et al.*, 2013b). For example, curcumin was recently found to attenuate inflammatory response in IL-1 β -induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in a mouse model (Moon *et al.*, 2010). In another study, the effect of dietary curcumin alone

or in combination with another compound, was found to alleviate carrageenan-induced paw inflammation in rats (Manjunatha *et al.*, 2006). To the best of our knowledge, there is no study investigating the *in vivo* effect of curcumin on neutrophils during inflammation mediated by LPS. Using the LPS-induced neutrophilic influx *in vivo* in the murine air pouch model, our results demonstrate that one i.p. administration of curcumin prior to LPS injection into pouches, significantly decreased the migration of neutrophils. Our results are consistent with those from Larmonier *et al.* reporting that administration of curcumin (administered thrice in olive oil at 12 h interval) prior to thioglycollate-induced peritonitis significantly reduced peritoneal recruitment of neutrophils (Larmonier *et al.*, 2011). Even if their protocol is different from us, it is clear that curcumin possesses the ability to inhibit *in vivo* recruitment of neutrophils. Moreover, we also show here that curcumin attenuated the local production of pro-inflammatory molecules, including several chemokines in the pouches. Therefore, at least at the analyte level, curcumin acts similarly *in vitro* on LPS-induced human neutrophils and *in vivo* into LPS-induced air pouch by decreasing the production of analytes, including several chemokines known to attract neutrophils and monocytes/macrophages.

The prolonged neutrophils lifespan into tissues, in addition with uncontrolled release of the toxic compounds they produce, largely exacerbates inflammation and could promote chronic and autoimmune diseases. Thus, targeting the apoptosis of neutrophils, and their functions, must be a key factor in the anti-inflammatory properties of curcumin.

Acknowledgement

The study was partially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by grants from Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et sécurité au travail (IRSST).

Declaration of conflicting interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

ARTICLE 3

Curcumin increases gelatinase activity in human neutrophils by a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-independent mechanism

La curcumine augmente l'activité gélatinases des neutrophiles humains par un mécanisme indépendant de la MAP kinase p38.

Francis Antoine¹ et Denis Girard¹

¹ Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Qc, Canada.

Manuscrit présenté tel que soumis pour une publication dans la revue *Jounal of Immunotoxicology*.

Contribution : En tant que premier auteur, j'ai réalisé toutes les expériences présentées et j'ai participé à la rédaction de toutes les sections.

RÉSUMÉ

La curcumine possède la capacité de moduler les réponses immunitaires dans plusieurs maladies chroniques et autoimmunes. Les neutrophiles sont d'importantes cellules du système immunitaire inné et sont aussi appelés les granulocytes. Les granules qu'ils contiennent dans leur cytoplasme sont libérées de manière hiérarchisée et selon une séquence d'événements prévisible durant la réponse inflammatoire. Certaines maladies autoimmunes et chroniques sont le résultat d'une défaillance dans la formation et/ou la structure des granules. Ici, nous rapportons que la curcumine induit la libération des trois sous-types de granules chez les neutrophiles. Tel qu'évaluée par cytométrie en flux, la curcumine augmente l'expression membranaire du CD35 (vésicules sécrétoires), du CD63 (granules azurophiles) et du CD66b (granules gélatinases) chez les neutrophiles. Aussi, la curcumine augmente l'activité enzymatique des gélatinases dans le milieu extracellulaire. Des immunobuvardages ont permis de montrer que la sécrétion de MMP-9 est augmentée par la curcumine. De plus, nous avons trouvé que la curcumine induit l'activation des protéines kinases p38 et ERK $\frac{1}{2}$. Toutefois, par opposition au fMLP, l'activité enzymatique des gélatinases et la sécrétion de MMP-9 n'ont pas été renversées par l'ajout d'un inhibiteur de p38, suggérant un mécanisme indépendant de p38 pour la curcumine. En conclusion, le fait que la curcumine induit la dégranulation des neutrophiles de manière très forte pourrait expliquer, au moins en partie, pourquoi cette molécule possède de si grandes propriétés anti-inflammatoires. Malgré tout, de futures recherches sont nécessaires pour pleinement découvrir le rôle de la curcumine sur la physiologie des neutrophiles et son rôle en inflammation.

Mots clés: Neutrophiles, curcumine, dégranulation, immunomodulation, MMP-9

ABSTRACT

Curcumin has been found to possess anti-inflammatory activities and, neutrophils, key players in inflammation, were previously found to be important targets to curcumin in few studies. For example, curcumin was found to induce apoptosis in neutrophils by a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanism. However, the role of curcumin on the biology of neutrophils is still poorly defined. The objective was to study the role of curcumin on neutrophil degranulation and to determine the role of p38 MAPK. Human neutrophils were freshly isolated from healthy individuals and incubated in vitro with curcumin. Degranulation was studied at three levels: cell surface expression of granule makers by flow cytometry; release of MMP-9 (gelatinase B) enzyme into supernatants by western blot; and gelatinase B activity by zymography. The activation of p38 MAPK was studied by monitoring its tyrosine phosphorylation levels by western blot and its role by the utilisation of a pharmacological inhibitor. Curcumin increased the cell surface expression of CD35 (secretory vesicle), CD63 (azurophilic granules) and CD66b (gelatinase granules) in neutrophils. Also, curcumin increased the release and enzymatic activity of gelatinase B in the extracellular milieu and activated p38 MAP kinase in these cells. However, in contrast to fMLP, the curcumin-induced enzymatic activity and secretion of gelatinase B were not reversed by p38 inhibitor. Our results demonstrate that curcumin induce degranulation in human neutrophils and that the increased gelatinase activity is not dependent on p38 MAPK activation. Therefore, degranulation is another human neutrophil function that could be modulated by curcumin.

Key words: Neutrophils, curcumin, degranulation, immunomodulation, MMP-9.

INTRODUCTION

In humans, polymorphonuclear neutrophil cells (PMNs) are the most abundant circulating leukocytes and are indispensable for innate immunity against invading microorganisms (Antoine *et al.*, 2013b, Tak *et al.*, 2013). PMNs are key player cells in inflammation and are known to be among the first cells to arrive to an inflammatory site. They are known to exert several beneficial functions, including phagocytosis and to produce a plethora of potent immunomodulatory molecules such as chemokines, cytokines, eicosanoids, and reactive oxygen species (ROS) (Amulic *et al.*, 2012, Duffin *et al.*, 2010, Mocsai, 2013). One important mechanism exert by neutrophils is degranulation leading to the release of diverse immunomodulatory agents, many of which are pro-inflammatory (Amulic *et al.*, 2012, Hoffstein *et al.*, 1982, Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Neutrophils possess four types of granules containing different, but some overlapping sets of proteins. Specific proteins in the lumen and on the membrane characterize the different types of granules. Azurophilic granules contain high amounts of lysosomal enzymes (Faurschou *et al.*, 2003) and are characterized by the expression of granulophysin (CD63) in their membranes (Cham *et al.*, 1994). Gelatinase granules are the principal reservoir of degrading enzymes, including metalloproteinases (N. Borregaard, 2010, Kjeldsen *et al.*, 1992). Specific granules are rich in antimicrobial peptides and participate in the antimicrobial activity of PMNs (N. Borregaard, 2010, Mollinedo *et al.*, 1997). These two latter subsets of granules are characterized by the presence of specific markers, including CD66, CD15 or CD67 (N. Borregaard, 2010, N. Borregaard *et al.*, 1997, N. Borregaard *et al.*, 2001). Finally, secretory vesicles are presumed to be formed by endocytosis (Borregaard, 2010, Borregaard *et al.*, 1987) and constitute the main source of plasma proteins and membrane-associated receptors

essential for PMN inflammatory response and are released easily in response to inflammatory agents. This latter type of granule is characterized by the presence of CD35 in the membrane (Perretti *et al.*, 2000).

Curcumin has been found to possess potent immunomodulatory properties and is especially recognized for its anti-inflammatory activity. In PMNs, curcumin has been found to induce apoptosis in a concentration-dependent manner (Hu *et al.*, 2005), agreeing with its known anti-inflammatory activity (Manjunatha *et al.*, 2006, Moon *et al.*, 2010, Shehzad *et al.*, 2013b). In addition, we recently demonstrated that, *in vitro*, curcumin inhibited agent-induced neutrophil functions such as the generation of ROS and cytokine production and, *in vivo*, curcumin was found to inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced neutrophilic inflammation (F. Antoine *et al.*, 2013b). Despite the fact that curcumin possesses strong immunomodulatory effects on PMNs, how curcumin alters degranulation in human neutrophils has never been investigated. In this study we found that curcumin increased the cell surface expression of the three markers of the principal subsets of granules in neutrophils. We also found that curcumin increased the enzymatic activity of gelatinase release in the supernatants by a p38-independent mechanism.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Otherwise specified, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Based on prior experiments, curcumin was used at 10 or 50 μ M throughout this study as previously reported (Antoine *et al.*, 2013b, Hu *et al.*, 2005).

Isolation of human neutrophils

Neutrophils were isolated from venous blood from healthy volunteers by dextran sedimentation followed by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech Inc., QC, Canada), as described previously (Antoine *et al.*, 2013b, Babin *et al.*, 2013). Blood donations were obtained from informed and consenting individuals according to institutionally approved procedures. Cell viability was monitored by trypan blue exclusion (>99%), and the cell purity (>97%) was confirmed by cytology from cytocentrifuged preparations stained with Hema Stain 3 (Fisher Scientific, Ottawa, ON).

Cell surface expression of granules markers

The cell surface expression of CD35, CD63 and CD66b was monitored by flow cytometry for assessing the degranulation of secretory, azurophilic, and gelatinase granules, respectively, as previously published (Babin *et al.*, 2013, Simard *et al.*, 2010). Non-specific binding of the antibodies was prevented by incubating the cells in PBS + 20% autologous serum for 30 min on ice. After several washes, primary antibodies

directed against CD35 (clone 555451 from BD Biosciences, Mississauga, ON), CD63 (clone 556019, BD Biosciences), CD66 (clone 80H3, AbD Serotec/Bio-Rad, Raleigh, NC) or an IgG1 isotypic control antibody (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) were added at a concentration of 0.5 µg/ml for 30 min on ice. Cells were then washed twice and incubated with 10 µg/ml FITC-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA) for 30 min at 4°C. After two washes, analysis was performed with a FACScan (BD Biosciences).

Gelatin Zymography

Neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI HEPES p/s) were incubated for 30 min under the indicated conditions. Cells were then centrifuged at 13000 rpm for 10 min and pellets were discarded. The supernatants (10 µl corresponding to 0.1×10^6 cells) were mixed with a non-reducing buffer (40% glycerol, Tris-HCl 1 M pH 6.8, SDS 8%) and run on 7.5% acrylamide gels containing 0.2% gelatin (Babin *et al.*, 2013). Gels were washed for 30 min twice with 2.5% Triton X-100 and incubated overnight in enzymatic digestion buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5mM). Gels were stained with Coomassie blue 0.1% and unstained as described previously (Babin *et al.*, 2013).

Phosphorylation of p38 MAP kinases.

Neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI1640 HEPES p/s) were stimulated with the indicated agonist for 30 min at 37°C. Cells were lysed in 4X Laemmli sample buffer, and aliquots corresponding to 1×10^6 cells were loaded onto 10% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1h at room temperature with Tris-buffered saline (TBS)-Tween 0.1% containing 3% of bovine serum

albumin (BSA). After blocking, the anti-phosphospecific p38 antibody (Bio-Source, Camarillo, CA) was added at 1:1000. The membranes were kept on a rocking platform overnight at 4°C, washed with TBS-Tween and incubated 1h at room temperature with rabbit anti-goat horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) at 1:25000 in TBS-Tween followed by several washes. Protein expression was revealed using an enhanced chemiluminescence Western Blot analysis detection system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). For protein loading determination, membranes were stripped and stained with the antibody directed against the corresponding unphosphorylated form of p38 (sc-535, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX).

Expression of MMP-9 in the external milieu

Neutrophils (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640, HEPES p/s) were stimulated with curcumin (10 or 50 μ M), fMLP (10^{-9} M) or buffer/diluent (HBSS 1% DMSO) for 30 min at 37°C. In some conditions, cells were pre-incubated with 2 μ M of the p38 MAPK inhibitor (p38i) or the diluent as control for 30 min prior the stimulation with the agonists. Cells were then centrifuged and pellets were discarded. Supernatants were used to assess the expression of MMP-9 by western blot. Briefly, a volume of 15 μ l of supernatants was mixed with 5 μ l of 4X Laemmli sample buffer, and aliquots corresponding to 0.15×10^6 cells were loaded onto 7.5% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 1h at room temperature with TBS-Tween 0.1% containing 3% BSA. After blocking, the anti-MMP-9 antibody (Abcam Cambridge, UK), was added at a final concentration of 1:1000 in TBS-Tween. The membranes were kept over-night on a rocking platform at 4°C, washed with TBS-Tween and incubated 1h at room

temperature with goat anti-mouse HRP-conjugated secondary antibody at 1:25000 in TBS-Tween followed by several washes.

Statistical analysis

The data are reported as mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA, and differences between tested groups and control were assessed using the Dunnett's Multiple Comparison Test with GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was established at $p < 0.05$.

RESULTS

Curcumin increases the cell surface expression of granule markers CD35, CD63 and CD66b.

As illustrated in Figure 23, curcumin significantly induced the cell surface expression of the three markers of the different subsets of granules even at the lowest concentration used of 10 µM. As expected, the positive control fMLP (0.1 µM) was able to induce the cell surface expression of CD35 (secretory) and CD66b (gelatinases), but not CD63 (azurophilic) (Simard *et al.*, 2010). Also, when used in combination with fMLP, curcumin was able to potentiate the cell surface expression of CD35 but not CD66b. Although fMLP by itself did not increase CD63, the combination curcumin + fMLP further increased the cell surface expression of this marker when compared to curcumin alone.

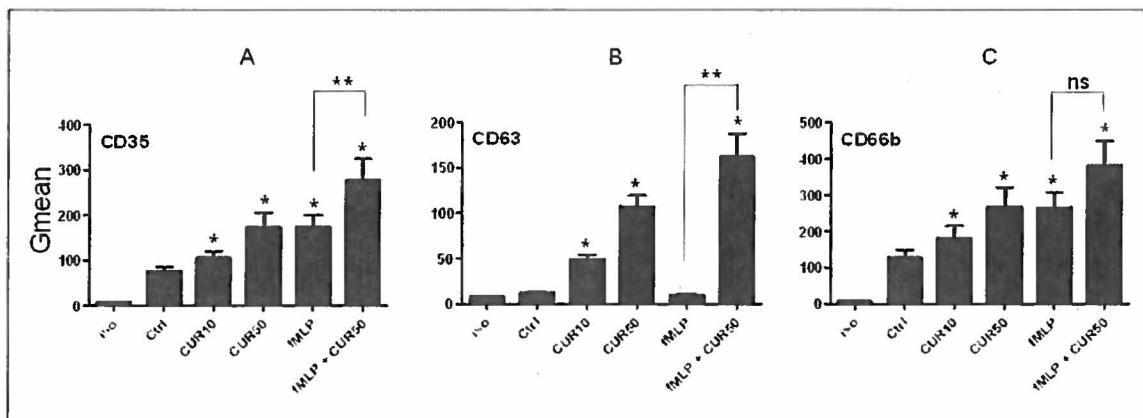


Figure 23: Curcumin induces cell surface expression of the three granule markers CD35, CD63 and CD66b, in human PMNs. Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640, HEPES p/s) were incubated with buffer (Ctrl), 10 µM curcumin (CUR10), 50 µM curcumin (CUR50), 10^{-9} M fMLP or a mixture of CUR50 + fMLP for 30 min. The cell surface expression of CD35 (A), CD63 (B) and CD66b (C) was monitored by flow cytometry as described in Materials and Methods. Results are the Gmean of fluorescence expressed as means \pm SEM, (n=5). *, p < 0.05 vs Ctrl; **p, < 0.05 vs fMLP. Iso, isotopic control for the assay; ns, not significant.

Curcumin enhances the release and enzymatic activity of gelatinase (MMP-9) in the extracellular milieu.

Knowing that curcumin increased the cell surface expression of granule markers, we next decided to determine whether or not curcumin could induce the release of MMP-9. Figure 24A illustrates that curcumin increased the protein expression of MMP-9 release into the supernatants of human neutrophils as assessed by western blot. Of note, the combination curcumin + fMLP did not result in an overexpression of the MMP-9 protein when compared to fMLP alone. Interestingly, zymography experiments reveal that curcumin increased the gelatinase enzymatic activity (Figure 24B). As for the protein expression, the enzymatic activity is not further increased by the mixture curcumin + fMLP.

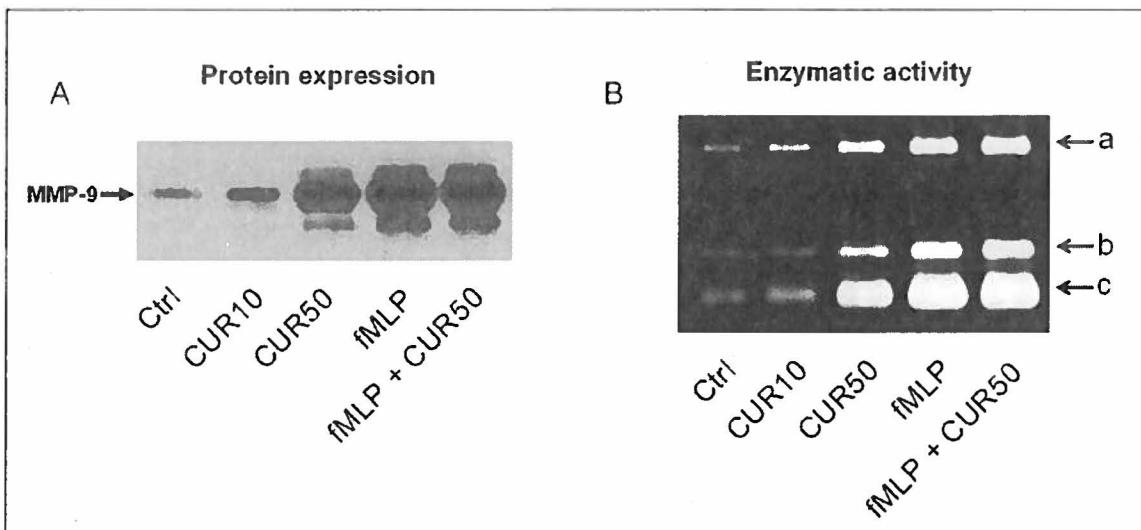


Figure 24: Curcumin increases the expression of MMP-9 and the gelatinase activity in the extracellular milieu. Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640, HEPES p/s) were stimulated for 30 min with buffer (Ctrl), 10 μ M curcumin (CUR10), 50 μ M curcumin (CUR50), 10^{-9} M fMLP or a mixture of CUR50 + fMLP and the supernatants were harvested and used to perform western blot experiments for the expression of MMP-9 at the protein level (A) or zymography assays for determining enzymatic activity (B) as described in Materials and Methods. A and B, one representative experiment out of 6. Note that the three gelatinase enzymatic activities (a,b,c) were similarly affected in all tested conditions.

Role of p38 MAPK in the release and enzymatic activity in curcumin-induced human neutrophils.

Curcumin is known to activate p38 MAPK in human PMNs and this kinase was found to be involved in the proapoptotic ability of curcumin (Hu *et al.*, 2005). However, the activation of p38 MAPK in priming condition is unknown. Also, its role in degranulation has never been investigated. As illustrated in Figure 25A, curcumin effectively activates p38 MAPK, but the activation state was not further increased when PMNs were treated with the mixture curcumin + fMLP. Next, we evaluated the role of p38 MAPK by a pharmacological approach and we observed that the protein expression of MMP-9 is significantly decreased in curcumin + fMLP vs fMLP alone. Although the MMP-9 expression was weaker in this cohort of blood donors, as opposed to Figure 24A, the results are clear cut and demonstrate also that the p38 MAPK inhibitor (p38i) did not significantly decrease the level of MMP-9 in response to curcumin alone. Next, we show that, as for the MMP-9 protein expression, the p38 MAPK inhibitor significantly reversed the gelatinase activity induced by fMLP, but not curcumin (Figure 26).

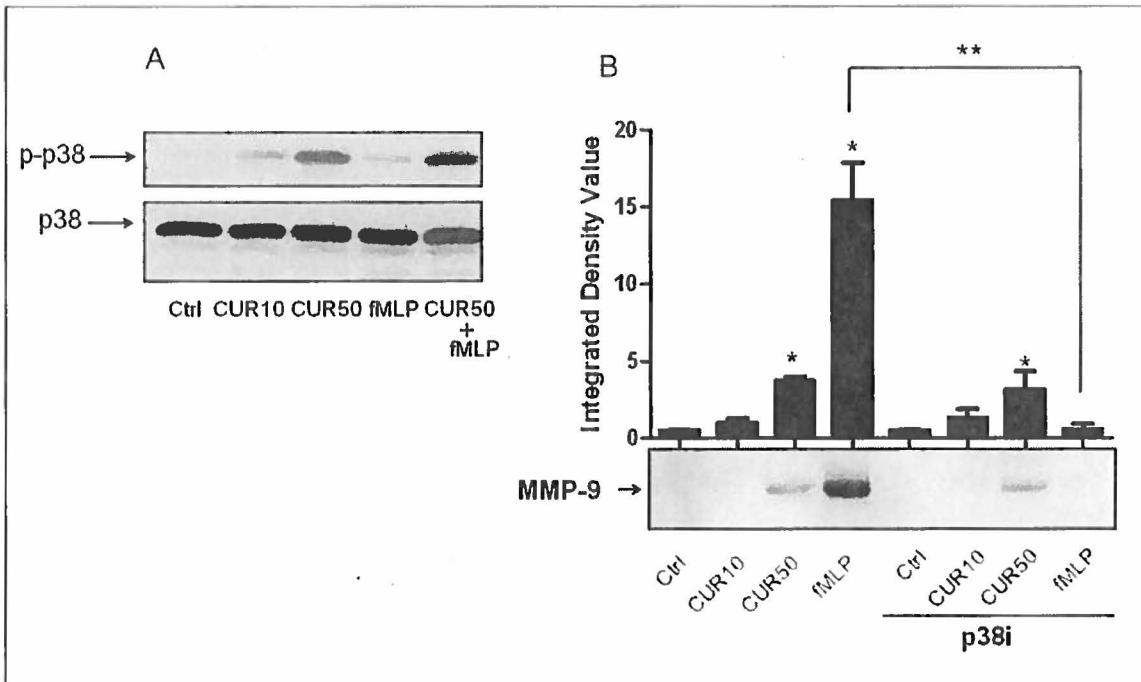


Figure 25: Curcumin does not further increased fMLP-induced p38 MAPK in human PMNs and does not increase MMP-9 protein expression by a p38 MAPK-dependent mechanism.

(A) Cells (10×10^6 cells/ml RPMI-1640, HEPES p/s) were stimulated for 30 min with buffer (Ctrl), 10 μ M curcumin (CUR10), 50 μ M curcumin (CUR50), 10⁻⁹M fMLP or a mixture of CUR50 + fMLP and activation of p38 MAPK was assessed by western blot experiments as details in Materials and Methods. (B) Cells were treated as in (A) but were pre-incubated with diluent or 2 μ M of the p38 MAPK inhibitor (p38i) for 30 min and MMP-9 protein expression was studied by western blot experiments as described in Materials and Methods. A, results are from one representative experiment out of 3. Equivalent loading were evaluated by the expression of the unphosphorylated form of p38. B, the densitometry analysis is plotted in the bar graph (integrated density value) to quantify the MMP-9 protein expression (means \pm SEM, n=3). Bottom, results from one representative experiment.

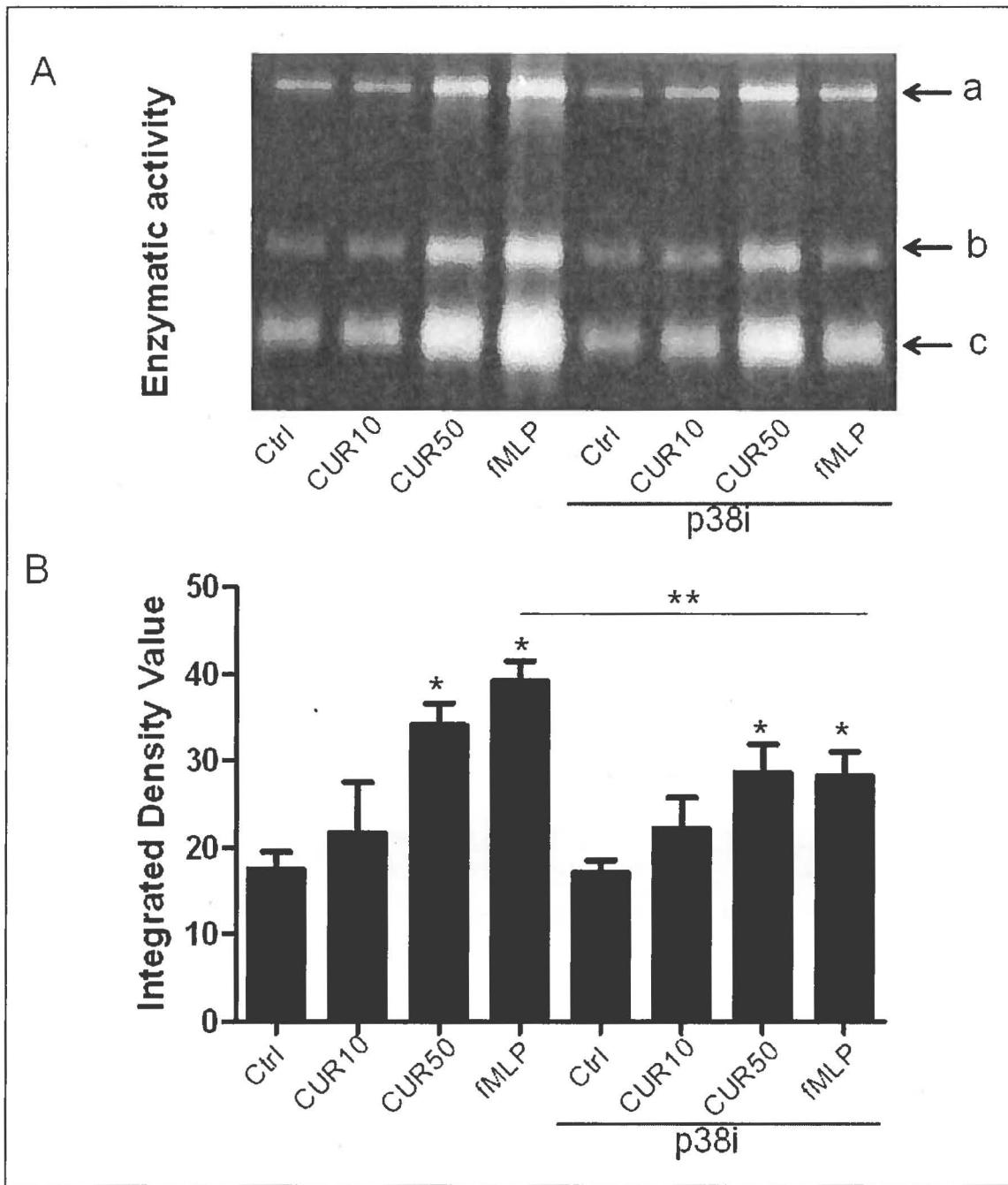


Figure 26: The ability of curcumin to increase gelatinase activity is unaffected by the p38 MAPK inhibitor. PMNs (10×10^6 cells/ml RPMI 1640 HEPES p/s) were pre-incubated with diluent or 2 μ M of the p38 MAPK inhibitor (p38i) for 30 min and then treated for 30 min with buffer (Ctrl), 10 μ M curcumin (CUR10), 50 μ M curcumin (CUR50), 10^{-9} M fMLP or a mixture of CUR50 + fMLP and the supernatants were harvested and used to perform zymography assays as described in Materials and Methods. A, one representative experiment showing the three gelatinase activities (a,b,c). B, Densitometry analysis of the three detected gelatinase activities were added together since they were affected similarly. Results are means \pm SEM ($n \geq 3$). *, $p < 0.05$ vs Ctrl; **, $p < 0.05$ fMLP without p38i vs fMLP with p38i.

Curcumin enhances phagocytosis but do not prime the fMLP-induced response

We next determined the effect of curcumin on the FcR-mediated phagocytosis of opsonized SRBCs in order to answer whether or not curcumin will enhance another fMLP-induced neutrophil response, since this is presently only observed for degranulation (this report). As illustrated in Figure 27, 50 μ M curcumin enhanced significantly phagocytosis ($60.9 \pm 3.6\%$ vs $40.4 \pm 3.1\%$ for Ctrl) as well as fMLP ($61.5 \pm 6.3\%$). Of note, the mixture curcumin + fMLP did not result in a further increase of phagocytosis. ($61.8 \pm 2.5\%$).

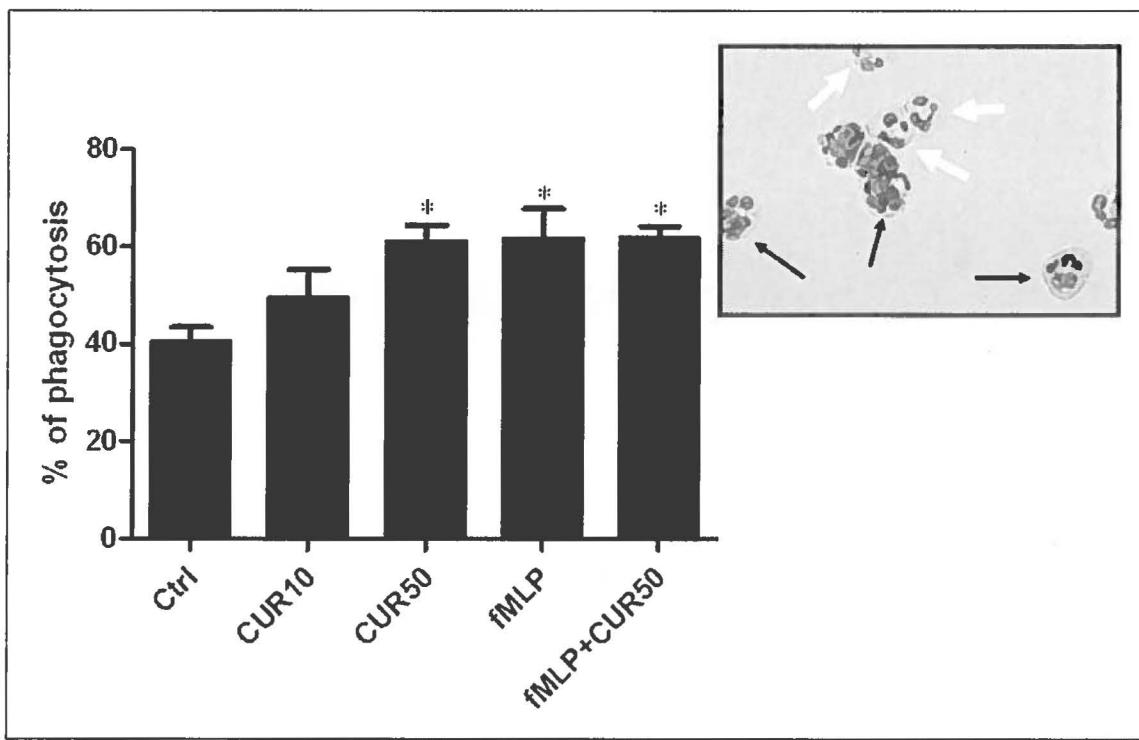


Figure 27: Curcumin enhances human PMN phagocytosis. Freshly isolated human PMNs (10×10^6 cells/ml in RPMI-1640, HEPES p/s) were stimulated for 30 min with buffer (Ctrl), 10 μ M curcumin (CUR10), 50 μ M curcumin (CUR50), 10^{-9} M fMLP or a mixture of CUR50 + fMLP. Phagocytosis was assessed by counting the number of cells ingesting SRBCs as described in Materials and Methods. Results are expressed as percentage of cells ingesting at least one SRBC (means \pm SEM, (n \geq 3). *, p < 0.05 vs Ctrl. Inset, a typical photography where neutrophil ingest (thin black arrows) or not (large black arrow) SRBCs. Magnification: 400X.

DISCUSSION

In this study, we showed that curcumin is able to induce the degranulation process in human neutrophils. This was demonstrated by the fact that curcumin increased the cell surface expression of the three markers CD35, CD63 and CD66b of the different subsets of granules, the release of MMP-9, a known constituent of the gelatinase granules (Soehnlein *et al.*, 2009) and the gelatinase activity present in the supernatants. In addition to the identification of this novel property for curcumin in human PMNs, we provide evidences that degranulation occurs by a p38 MAPK-independent mechanism. Since this kinase was previously found to be involved in the proapoptotic activity of curcumin (Hu *et al.*, 2005), this indicates that curcumin can probably induce other signalling pathways in human neutrophils. This remains to be investigated.

Over the years, several studies showed potent anti-inflammatory roles of curcumin (Aggarwal *et al.*, 2009, Larmonier *et al.*, 2011, Shehzad *et al.*, 2013b). However, the effect of curcumin on the degranulation of PMNs has never been reported prior this study and, yet, little is known about the precise mechanisms involved in the immunomodulatory activities of curcumin. In fact, curcumin is a pleiotropic molecule having a plethora of biological targets (Aggarwal *et al.*, 2007, Aggarwal *et al.*, 2009). Although, the degranulation process is often viewed as a part of the inflammatory response, one has to remember that this is always context-dependent. Also, it is plausible that the proapoptotic activities of curcumin counteract proinflammatory activities. The capacity of curcumin to induce the degranulation of the azurophilic granules may be a considerable element in the mechanism responsible for the anti-inflammatory properties of curcumin. It is known that some autoimmune and/or

inflammatory diseases are the result of the impairment in the formation and/or the structure of granules in phagocytes, and thus causing a chronic excessive inflammatory reaction because, for example, recurrent infections remain unresolved.

Given the ability of curcumin to trigger a rapid and strong degranulation of the azurophilic granules (and other subsets), one can imagine that this process could help the immune cells to resolve chronic inflammatory disorders set by recurrent infections or deficiencies of the immune system. Azurophilic granules contain high amounts of microbicidal proteins. Including defensin, presenilin, stomatin, and myeloperoxidase (Bainton *et al.*, 1971, Cham *et al.*, 1994). Also, granulophysin (CD63) is a platelet lysosomal membrane protein commonly used as a marker of azurophilic granules (Cham *et al.*, 1994) secreted only following intense stimulation of neutrophils (Faurschou *et al.*, 2003). In fact, exocytosis of azurophilic granules after a stimulation with phorbol myristate acetate (PMA) or fMLP, two potent leukocyte activators, is limited in time and only occurs to a minimal extent (Estensen *et al.*, 1974). Therefore, the capacity of curcumin to induce the degranulation of azurophilic granules can be viewed as a major mechanism differentiating curcumin than other molecules and might be the result of a specific mode of action, probably due to its hydrophobic molecular structure. In that perspective, the high lipid content of granules may explain the effects of curcumin on the exocytosis of granules, since curcumin was showed to be involved in intracellular lipid traffic (Canfran-Duque *et al.*, 2013). Another study reported that curcumin stimulated the release of cholesterol and the lysosomal β -hexosaminidase enzyme, as well as the exosome markers, flotillin-2 and CD63 in HepG2 hepatocarcinoma cells and human THP-1 differentiated macrophages (Canfran-Duque *et al.*, 2013). This is in agreement with our present data that curcumin increased the cell surface expression of CD63 in human PMNs. The authors attributed their findings to the exosomes/microvesicles

secretion induced by curcumin. In PMNs, CD63 marker refers to the azurophilic granules known to be the major subset showing microbicidal activity. Recently, we demonstrated that curcumin inhibited fMLP- or lipopolysaccharide (LPS)-induced suppression of human neutrophil apoptosis and reversed the ability of PMA to induce reactive oxygen species (Antoine *et al.*, 2013b). In this study, using an antibody array approach, curcumin was also found to inhibit LPS-induced cytokine production, including several important chemokines such as MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 (CXCL-8) and GRO- α . Interestingly, the inhibitory effect of curcumin on LPS-induced NF- κ B activation in human PMNs was also observed, fitting well with the potent inhibitory activity of curcumin against NF- κ B previously reported by others (Zhou *et al.*, 2011). Therefore, our present data showing that curcumin induced degranulation by itself and that it can enhance the response of fMLP indicate that curcumin alters various PMN functions *in vitro*. *In vivo*, using the murine air pouch model of acute inflammation, we have previously demonstrated that intraperitoneal administration of curcumin inhibited LPS-induced neutrophilic infiltration and, interestingly, curcumin also decreased the local production of several cytokines/chemokines induced by LPS, including, but not limit to, MIP-1 α and MIP-1 β (Antoine *et al.*, 2013b).

Acute inflammation occurs a few hours following trauma or infection and is characterized by PMN adhesion to the endothelial barrier and migration toward affected tissues (Kumar *et al.*, 2010). PMNs are the first immune cells to arrive at the inflammatory site and they are crucial for the containment of pathogens within the infected site. In some cases, the acute response fails to eliminate pathogens and the response is exacerbated, leading to a chronic inflammatory state. This attests to the importance of an efficient and fast clearance of pathogens. Degranulation and phagocytosis are certainly the two most

important functions of PMNs for fighting against pathogen. Therefore, based on the ability of curcumin to induce these two responses, curcumin possesses important biological activities beneficial for human health. In one hand, curcumin induced both degranulation and phagocytosis (this report), and, in one other hand, by its ability to induce apoptosis, curcumin simultaneously promote resolution of inflammation, largely known to occur via elimination of apoptotic neutrophils (Akgul *et al.*, 2001, El Kebir *et al.*, 2010).

In conclusion, the results of this present study help in better understanding the previously reported beneficial effects of curcumin in a variety of inflammatory disorders (Aggarwal *et al.*, 2009, Larmonier *et al.*, 2011, Shehzad *et al.*, 2013b, Taylor *et al.*, 2011). Curcumin increases important neutrophil functions involved in host defense, including degranulation and phagocytosis, and possesses anti-inflammatory activities by virtue of its proapoptotic effects. Therefore, although its mode of action is still not completely understood, it can be conclude that curcumin possesses important beneficial effects for human health related to its biological activity for PMNs.

Acknowledgement

The study was partially supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Declaration of conflicting interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

DISCUSSION

4.1 Effets de la curcumine sur la physiologie des neutrophiles.

La physiologie des neutrophiles en conditions inflammatoires est un axe de recherche des plus intéressants car il permet de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent les maladies inflammatoires aiguës et chroniques. Étonnamment, on ne retrouve que très peu de données concernant les effets de la curcumine sur la physiologie des neutrophiles. Nous nous sommes donc intéressés à cette facette pour en connaître plus sur les mécanismes d'action de la curcumine.

Outre l'apoptose, la production des réactifs oxygénés est une fonction très importante des neutrophiles. Il se trouve justement que les propriétés de la curcumine soient traditionnellement attribuées à ses capacités antioxydantes. Nous nous sommes donc intéressé à évaluer l'effet de la curcumine sur la production des réactifs oxygénés, un procédé largement effectué par la NADPH oxydase chez les neutrophiles. Les résultats obtenus montrent la capacité inhibitrice de la curcumine sur la production de ROS induite par le PMA chez les neutrophiles (voir article 2). Il est connu que le PMA active la NADPH oxydase via l'activation de la PKC (Gray *et al.*, 2013). Malheureusement, nous ne pouvons pas être certains que l'inhibition de la production de ROS par la curcumine est reliée à l'inhibition de la signalisation cellulaire dépendante de PKC de par les expériences réalisées dans ce projet. Néanmoins, étant donné l'importance du stress oxydatif dans les procédés proinflammatoires, il est permis de suggérer que l'inhibition de la NADPH oxydase par la curcumine est un élément majeur dans ses propriétés anti-inflammatoires.

Une autre étude stipule que la curcumine interagirait directement dans l'assemblage de la NADPH oxydase *in vitro* (Derochette *et al.*, 2013). Il est alors plausible que la

curcumine interagirait directement sur la structure de la NADPH oxydase (inhibant l'activation de son complexe catalytique) ce qui préviendrait son activation par des signaux secondaires comme les médiateurs lipidiques ou le calcium (Brechard *et al.*, 2013). Or, il a été récemment rapporté que la curcumine influence aussi le métabolisme des lipides et du calcium (Takikawa *et al.*, 2013, Zingg *et al.*, 2013). Les lipides sont précurseurs de nombreux médiateurs de l'inflammation (prostaglandines, leucotriènes) alors que le calcium joue un rôle en signalisation cellulaire. La combinaison de ces derniers résultats avec les nôtres nous permet de croire que la capacité d'inhibition de la production de réactifs oxygénés causée par la curcumine n'est pas spécifique à un seul mécanisme et ceci pourrait expliquer la complète inhibition observée.

La production et la sécrétion des cytokines et des chimiokines est une constante des maladies inflammatoires chroniques. Nous nous sommes donc intéressés à connaître l'influence de la curcumine sur la sécrétion des cytokines induites par le LPS chez les neutrophiles. Pour ce faire, nous avons utilisé les surnageants de neutrophiles traités avec le LPS (en présence ou absence de curcumine). Le LPS active NF- κ B chez les neutrophiles et induit la sécrétion de cytokines et de chimiokines. Les résultats obtenus montrent que la curcumine inhibe la sécrétion de certaines cytokines et des chimiokines induites par le LPS (voir article 2). Les résultats montrant que la curcumine inhibe la production des chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et IL-6 sont présentés à l'Annexe I. Ces derniers confirment de précédents résultats obtenus à l'aide de macrophages et de cellules YAMC montrant que la curcumine inhibe la production de MIP-1 α (Larmonier *et al.*, 2011). De plus, nous avons remarqué que la curcumine semble induire la sécrétion d'IL-8, ce qui n'avait jamais été rapporté auparavant. Nous avons donc voulu confirmer ce résultat en analysant les surnageants à l'aide d'une méthode quantitative, l'ELISA.

Effectivement, la curcumine induit une légère sécrétion d'IL-8, mais le plus remarquable est qu'elle inhibe de façon significative (réduisant plus de la moitié) la sécrétion d'IL-8 induite par le LPS. Il existe donc une dualité dans la sécrétion d'IL-8 induite par la curcumine. Selon le contexte, la curcumine peut soit stimuler ou inhiber (de façon relative) la sécrétion d'IL-8. Il en va de même pour la sécrétion de GM-CSF.

Suite aux résultats obtenus sur la sécrétion des cytokines et des chimiokines, nous nous sommes demandé si la curcumine pouvait inhiber le facteur de transcription NF-κB, un facteur très important dans la sécrétion des cytokines et des chimiokines chez les neutrophiles (Simard *et al.*, 2013). Effectivement, tel que montré par les techniques de retard sur gel et par ELISA, nous avons observé que la curcumine inhibe l'activation (ou du moins la translocation nucléaire) de NF-κB induite par le LPS chez les neutrophiles (voir article 2). Malgré la masse de données concernant l'inhibition de NF-κB par la curcumine, nous sommes les premiers à avoir montré l'inhibition de NF-κB par la curcumine chez les neutrophiles humains. Néanmoins, le rôle de NF-κB dans les effets anti-inflammatoires de la curcumine chez les neutrophiles reste encore à être pleinement déterminé.

Le facteur de transcription NF-κB est un point central de l'inflammation. Son activation est une condition *sine qua non* de la signalisation inflammatoire chez les neutrophiles. Malheureusement, nous ne pouvons pas attribuer avec certitude que l'inhibition de la sécrétion des cytokines est due à l'inhibition de NF-κB de par la portée des résultats. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de NF-κB, comme le BAY 11-7085, nous aurait aidé à comprendre le rôle de la curcumine dans l'inhibition observée chez les neutrophiles. Toutefois, considérant l'importance de ce facteur de transcription en

inflammation et les effets de la curcumine sur ce processus, il est possible d'associer les capacités anti-inflammatoires de la curcumine à sa capacité d'inhiber NF-κB chez les neutrophiles, et de potentiellement relier ce phénomène à la diminution de la sécrétion des cytokines et chimiokines.

La dégranulation est un processus très important dans la physiologie des neutrophiles. Une défaillance dans ce processus mène à certaines complications immunitaires requérant un soin médical constant (Hager *et al.*, 2010). Les effets de la curcumine sur la dégranulation des neutrophiles n'ont jamais été évalués avant notre étude. Étonnamment, la curcumine induit ce processus alors que, de façon générale, cette molécule a plutôt tendance à inhiber les procédés. Néanmoins, l'étude des effets de la curcumine sur la dégranulation nous a permis d'en savoir plus sur les mécanismes employés par cette molécule en inflammation. Effectivement, il est étonnant de constater que la curcumine induise la dégranulation des neutrophiles par un mécanisme indépendant de la MAPK p38, une kinase qui est connue pour réguler ce processus chez les neutrophiles (Binet *et al.*, 2008).

La présence des marqueurs à la surface membranaire est le résultat de l'exocytose des granules qui, suite à leur fusion avec la membrane plasmique, exposent les constituants protéiques contenus dans leur membrane à la surface de la cellule. L'analyse par cytométrie en flux a permis de démontré que la curcumine induit la dégranulation des trois types majeurs de granules chez les neutrophiles (voir article 3). Effectivement, la curcumine induit la dégranulation des granules azurophiles (CD63), des vésicules sécrétoires (CD35) et des granules gélatinases (CD66b). Étonnamment, la curcumine induit la dégranulation des granules azurophiles, un type de granules qui ne subit pas facilement l'exocytose. À titre d'exemple, un activateur connu de la dégranulation des

neutrophiles, le fMLP, ne parvient pas à déclencher la dégranulation des granules azurophiles. Ces résultats suggèrent donc un mécanisme différent pour la curcumine.

Fait particulier, l'augmentation de l'expression du marqueur CD63 à la surface membranaire des neutrophiles est plus prononcée en présence de fMLP, qui a lui seul ne parvient pas à moduler ce procédé. Ceci suggère que la curcumine à la capacité d'augmenter les réponses des neutrophiles vis-à-vis les stimuli inflammatoires, notamment ceux de type bactériens. Il est donc possible que la curcumine viendrait stimuler les processus antibactériens reliés à la dégranulation des neutrophiles. Effectivement, les granules azurophiles sont justement reconnus comme étant des éléments majeurs des phagolysosomes en y apportant les constituants nécessaires à la destruction chimique et protéolytique des microbes. D'autres expériences ont permis de démontrer que la curcumine augmente le processus de phagocytose des neutrophiles. Mis ensemble, ces derniers résultats indiquent que la curcumine pourrait jouer un rôle bénéfique lors d'une défaillance de ces processus chez les individus immunosupprimés ou chez ceux qui souffre d'inflammation chronique causée par la persistance d'une infection bactérienne ou fongique.

Les résultats concernant la dégranulation nous révèlent un aspect encore inexploré de la curcumine sur la physiologie des neutrophiles. Comment se fait-il que cette molécule active autant ce procédé? Quel est le rôle de ce phénomène dans les capacités anti-inflammatoires de la curcumine? Peut-être que cet effet aurait un rôle à jouer dans la prévention de l'inflammation causé par les infections à cause du pouvoir microbicide des granules. L'induction de la dégranulation pourrait aussi expliquer la sécrétion des cytokines observée précédemment. Une piste d'explication réside peut-être dans le fait que la curcumine soit une molécule hautement lipophile et qui a récemment été

démontré pour influencer le métabolisme des lipides (Canfran-Duque *et al.*, 2013), les constituants majeurs des vésicules. Finalement, un autre mécanisme nécessaire au processus d'exocytose est la mobilisation du calcium (Pozzan *et al.*, 1983). Or, il se trouve que la curcumine est un chélateur du calcium et est reconnue pour inhiber la rétention du calcium dans le réticulum endoplasmique (Zhu *et al.*, 2013). La curcumine influencerait donc la physiologie des vésicules et du réticulum endoplasmique.

Il est possible que les effets de la curcumine puissent être attribuables à son hydrophobicité. À travers la littérature on s'accorde pour dire que la curcumine possède de très nombreuses cibles sur de très nombreux systèmes. Comment alors expliquer son manque de spécificité? Les processus biologiques reposent sur des signalisations et des mécanismes très spécifiques dans lesquelles les structures sont très souvent associées aux fonctions. Une approche originale pour tenter d'expliquer les effets de la curcumine serait de répondre à la question suivante: qu'ont en commun toutes les cibles de la curcumine? L'approche des lipides et de l'hydrophobicité de la curcumine semble être une voie prometteuse. Selon cette façon de penser, l'interaction de la curcumine avec les systèmes membranaires et lipidiques (les récepteurs, les radeaux lipidiques, les médiateurs lipidiques, le réticulum endoplasmique ou le trafic vésiculaire) serait le siège des effets observés. Dans le même ordre d'idées, la curcumine procure des effets bénéfiques sur l'athérosclérose de par ses capacités à moduler le métabolisme des lipides (Hasan *et al.*, 2014). En même temps, l'hydrophobicité de la curcumine semble limiter la portée thérapeutique d'un point de vue systémique. Le manque de solubilité de la curcumine serait la cause de sa faible biodisponibilité. D'ailleurs, sa diffusion à travers tout l'organisme, pouvant ainsi lui conférer des vertus thérapeutiques sans équivoque, fait l'objet d'une nouvelle branche de recherche biomédicale appelée *drug delivery*.

4.2 Effets de la curcumine sur l'apoptose des neutrophiles.

Nous nous étions intéressés en premier lieu à l'effet de la curcumine sur l'apoptose des neutrophiles à cause de l'importance de ce processus en inflammation. Effectivement, tel que démontré par les récentes études sur le sujet, la curcumine est une molécule capable d'induire l'apoptose de plusieurs types cellulaires, incluant les neutrophiles (Antoine *et al.*, 2013b, Hu *et al.*, 2005).

Afin de limiter les effets de la curcumine aux effets apoptotiques et non nécrotiques, nous avons effectué des tests de dose-réponse sur la viabilité cellulaire après 24 heures de traitement. À l'aide de ces tests effectués avec le bleu de trypan, nous avons pu établir à 50 µM la concentration optimale de curcumine (dose maximale sans nécrose) pour les traitements cellulaires subséquents. Outre la concentration de curcumine, nous avons aussi démontré que la concentration cellulaire est un facteur qui influence le taux d'apoptose (voir article 1). Cette modulation du taux d'apoptose peut s'expliquer par le fait que l'augmentation du nombre de cellules pour un même volume diminue le ratio molécules/cellules et de ce fait diminuant les effets de la curcumine. Nous avons donc choisi une concentration cellulaire de 10×10^6 cellules/ml pour l'ensemble des expériences. En l'occurrence, ce taux reflète mieux les conditions physiologiquement inflammatoires des neutrophiles.

Il était connu que la curcumine active les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose, donc afin de vérifier d'abord la présence de ces phénomènes chez les neutrophiles nous avons évalué l'influence de la catalase et du GM-CSF sur l'apoptose induite par la curcumine. L'annexe II nous montre que l'apoptose des neutrophiles (spontanée ou induite à 20 ou à 50 µM curcumine) est renversée de façon significative par l'ajout de

catalase ou de GM-CSF. L'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) serait reconnue comme un élément responsable de l'apoptose spontanée des neutrophiles (Binet *et al.*, 2008). Les propriétés antioxydantes de la curcumine vis-à-vis la NADPH oxydase ne favorise pas la survie des neutrophiles à l'instar de la catalase. Par contre les neutrophiles stimulés dans cette série d'expériences n'ont pas été soumis à des stimuli, *a priori*, inflammatoires (comme le PMA).

Toute molécule pouvant prolonger la survie des neutrophiles peut être vu comme un stimulus inflammatoire potentiel. Nous ne pouvons affirmer avec certitude que la curcumine influence l'activation de la voie intrinsèque de par la portée des résultats, mais il est permis de croire que l'accumulation de H_2O_2 est un élément majeur dans l'induction de l'apoptose par la curcumine. Les effets prolifératifs du GM-CSF permettent de prévenir l'apoptose spontanée des neutrophiles. Le GM-CSF est souvent rencontré par les neutrophiles dans les sites inflammatoires et en stimulant la survie de ceux-ci contribue aux effets proinflammatoires. Le GM-CSF promeut la survie des neutrophiles en stimulant, entre autres, l'activation de la MAP kinase ERK $\frac{1}{2}$ et en prévenant l'activation de la caspase-8 (Zhang *et al.*, 2004). Il contribue aussi au stress oxydatif en stimulant la production de réactifs oxygénés par les neutrophiles.

Plusieurs indices nous permettaient de croire que la curcumine pouvait induire l'apoptose via la voie du stress du réticulum endoplasmique car cette molécule active la UPR chez les HL-60, les cellules précurseurs des neutrophiles (Cao *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2013, Pae *et al.*, 2007). Nous avons montré, par le biais de marquage métabolique (inhibition de la synthèse *de novo* de protéines) et d'immunobuvardages de type western (activation de eIF2 α et de PERK et diminution de l'expression de HSP70 et HSP90 et de la polyubiquitination des protéines), que la curcumine active, ou du moins affecte, la

réponse au stress du réticulum endoplasmique chez les neutrophiles. La polyubiquitination des protéines et l'expression des chaperonnes HSP70 et HSP90 sont deux processus directement reliés à la capacité de dégradation des protéines par le protéasome (Saeki *et al.*, 2012).

En tenant compte des résultats obtenus, nous sommes en droit de croire que la curcumine diminue l'efficacité de la machinerie de dégradation protéique de par la baisse de l'expression de ces constituants protéiques. De façon plus subtile, la baisse de l'expression de ces protéines pourrait aussi être due à leur dégradation. Une explication possible des résultats proviendrait de l'activation rapide des caspases, notamment la caspase-3, par la curcumine. Il faut ajouter à cela que la synthèse *de novo* des protéines est diminuée par la curcumine, ce qui est paradoxal pour augmenter l'expression d'une protéine.

En comparaison, ces résultats sont contraires à ceux d'un autre agent proapoptotique et activateur de la voie du stress du réticulum endoplasmique, le trioxyde d'arsenic (As_2O_3). Le trioxyde d'arsenic est un agent qui active la voie du stress du réticulum endoplasmique par un mécanisme qui augmente la synthèse *de novo* des protéines (Binet *et al.*, 2006), ainsi que la polyubiquitination des protéines, mais aussi des caspase-3, caspase-8 et caspase-9 chez les neutrophiles (Binet *et al.*, 2010a). L'activation d'une seule voie apoptotique semble donc être un phénomène difficilement observable chez les neutrophiles. Ultimement, malgré le fait que ces deux activateurs du stress du réticulum possèdent des mécanismes différents, chacun d'eux accélère l'apoptose des neutrophiles.

La réponse au stress du réticulum endoplasmique est un mécanisme d'adaptation à la présence de protéines mal repliées. Cette réponse a pour but de rétablir l'homéostasie normale des cellules en limitant la synthèse et en favorisant les modifications post-traductionnelles des protéines. Si les mécanismes adaptatifs ne peuvent pallier à l'accumulation des protéines mal repliées, l'apoptose est déclenchée par un mécanisme qui n'est pas encore complètement compris. Toutefois, malgré l'accumulation de données récentes concernant ce processus, de futures recherches restent à être accomplies pour pleinement déterminer les mécanismes d'activation de cette voie chez les neutrophiles.

Finalement, il serait intéressant d'évaluer en profondeur l'activation de toutes les voies apoptotiques induites par la curcumine chez les neutrophiles. Il est possible que l'induction de l'apoptose induite par la curcumine ne soit pas le résultat de l'activation d'une seule voie apoptotique, mais plutôt le résultat de l'accumulation de celles-ci et du chevauchement des signaux proapoptotiques qu'elles génèrent. La caspase-3 est dite effectrice car elle est le point culminant de toutes les voies apoptotiques (initiées par des caspases spécifiques). Dans notre étude, nous montrons que la caspase-3 est fortement activée dans un intervalle de temps se situant entre 1 heure et 2 heures de traitement, ce qui suggère un mécanisme d'induction très efficace de la part de la curcumine. La contribution simultanée de plusieurs voies apoptotiques pourrait donc expliquer cette activation rapide de la caspase-3.

Dans le but d'éclaircir le rôle de l'apoptose dans les propriétés anti-inflammatoires de la curcumine, nous avons évalué ses effets apoptotiques en présence de produits bactériens (fMLP et LPS) reconnus pour stimuler la survie des neutrophiles (Fox *et al.*, 2010). Dans une expérience jamais réalisée auparavant, nous avons pu démontrer que

la curcumine renverse la survie des neutrophiles induite par les stimuli inflammatoires de type bactérien (fMLP et LPS) (voir article 2). Ce résultat indique que la curcumine pourrait jouer un rôle dans la résolution de l'inflammation due à la réponse des neutrophiles aux infections. Il est donc plausible que la curcumine puisse induire l'apoptose des neutrophiles directement dans les tissus ou dans les tissus synoviaux. L'importance de ce résultat réside dans le fait que l'apoptose des neutrophiles (et de leur efferocytose par les phagocytes professionnels) est une étape critique dans la résolution de l'inflammation et dans la cicatrisation des tissus suite à une lésion ou une infection.

*4.3 Effets de la curcumine *in vivo**

Pour évaluer l'effet de la curcumine sur les neutrophiles *in vivo*, nous avons utilisé le modèle inflammatoire murin de la poche d'air. Hans Selye fut le premier à caractériser ce modèle inflammatoire chez les rats (Selye, 1953). Ce modèle consiste à injecter de l'air stérile sous la surface dorsale d'un animal (rat ou souris). Cet influx crée une cavité à l'intérieur de laquelle peut s'exercer une réponse inflammatoire suite à l'injection d'un stimulus (carragénine ou LPS). L'injection d'air doit s'étaler sur plusieurs jours afin de permettre le développement d'une couche cellulaire périphérique concentrée en fibroblastes, macrophages et mastocytes. Cette couche cellulaire comporte des similarités à celle retrouvée dans les tissus synoviaux (J. C. Edwards *et al.*, 1981). Cette cavité faisant guise de chambre de culture permet de concentrer la réponse inflammatoire uniquement à l'intérieur de la poche car la couche cellulaire tapissant celle-ci empêche la diffusion du produit injecté.

Ce modèle présente des avantages quant à son utilisation. Il nous permet, dans un premier temps, d'évaluer l'infiltration leucocytaire au site inflammatoire (majoritairement des neutrophiles et des macrophages). Puis, dans un deuxième temps, il nous permet d'évaluer l'expression des cytokines et des chimiokines présentes dans les exsudats issus du site inflammatoire. Dans le cadre de ce doctorat, le LPS a été utilisé pour attirer un grand nombre de neutrophiles rapidement afin d'évaluer les effets anti-inflammatoires de la curcumine.

Les résultats obtenus grâce au modèle ont pu montrer que l'infiltration des neutrophiles dans la cavité inflammatoire induite par le LPS est significativement réduite par la curcumine (voir article 2). Par contre, d'autres expériences nous ont permis de constater que la voie d'administration selon laquelle la curcumine est acheminée dans la poche d'air influence le résultat. Effectivement, la voie par administration i.p. possède beaucoup plus de potentiel que la voie directe (injection directement dans la poche), pour inhiber l'infiltration leucocytaire au site inflammatoire. Effectivement, l'administration intrapéritonéale de la curcumine préalable à la stimulation avec le LPS a permis de diminuer de près de la moitié la quantité de leucocytes attirés dans la poche d'air, contrairement à la voie directe qui ne semblait pas vraiment affecter la quantité de leucocytes attirés dans la poche d'air.

L'approche par microréseaux d'anticorps nous a permis de montrer que la curcumine influence l'expression des cytokines et des chimiokines dans les exsudats des souris traitées. Les résultats bruts de l'analyse des exsudats par microréseaux d'anticorps sont montrés à l'annexe III. L'analyse de l'expression des cytokines et chimiokines nous a permis de montrer que la curcumine inhibe partiellement la sécrétion de BLC, MIP-1 α , MIP-1 β et MIP2 (voir article 2). Mis ensemble, ces résultats indiquent que la curcumine

présente un potentiel pour son utilisation dans les traitements de l'inflammation reliée aux neutrophiles car l'infiltration leucocytaire et la sécrétion des cytokines sont des éléments majeurs dans l'induction d'une réponse inflammatoire chronique.

Ces résultats *in vivo* obtenus avec les souris sont en accord avec les résultats *in vitro* obtenus précédemment avec les neutrophiles humains concernant l'effet de la curcumine sur la sécrétion des cytokines. Par contre, on voit aisément que la portée d'inhibition de la curcumine pour ce processus est fortement réduite dans les conditions *in vivo* comparé aux conditions *in vitro*. L'environnement *in vivo* est différent de l'environnement *in vitro*, il n'est donc pas possible de savoir si cette dernière modulation de la sécrétion des cytokines et des chimiokines par la curcumine est comparable à celle observée précédemment chez les neutrophiles humains. De plus, étant donné que la majeure partie des cytokines sécrétées proviendraient des cellules tapissant la poche d'air, et que la curcumine a été injectée de façon intrapéritonéale, il est difficile de déterminer le rôle de la curcumine sur la sécrétion des cytokines par ces cellules *in vivo*. Peut-être justement que les résultats observés proviennent du fait que la curcumine n'est pas en contact direct avec les cellules (fibroblastes, cellules adipeuses, cellules dendritiques, etc.) tapissant la poche d'air chez les souris.

Par contre, malgré la faible inhibition observée en ce qui a trait à la sécrétion des cytokines, la curcumine inhibe la migration des leucocytes vers le site inflammatoire dans ce modèle. L'administration intrapéritonéale a cet avantage de contourner l'effet de premier passage de la curcumine (lors de l'absorption) et de théoriquement augmenter la biodisponibilité de cette dernière. Nos résultats confirment les effets bénéfiques de la curcumine dans un modèle inflammatoire *in vivo* chez les souris, et sont en accord avec ceux précédemment observés par Larmonier *et al.* à l'aide d'un modèle *in vivo* de

maladie inflammatoire du colon (Larmonier *et al.*, 2011). Notre étude a permis de montrer que la curcumine possède des effets anti-inflammatoires *in vivo* dans un modèle d'inflammation aiguë.

CONCLUSION

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier les mécanismes d'induction de l'apoptose de la curcumine chez les neutrophiles. Afin d'en connaître davantage sur les modes d'action de la curcumine à l'intérieur des neutrophiles, nous avons déterminé ses effets sur plusieurs autres paramètres de la physiologie des neutrophiles, incluant la production de réactifs oxygénés, la production de cytokines et de chimiokines, l'activation du facteur NF- κ B et la dégranulation. De plus, nous avons confirmé les effets de la curcumine à l'aide d'un modèle inflammatoire *in vivo*. Les résultats obtenus lors de cette étude ont confirmé les effets anti-inflammatoires de la curcumine, mais surtout ils apportent une compréhension supplémentaire des mécanismes sous-jacents à son activité anti-inflammatoire et montrent encore une fois que la curcumine apparaît réellement comme une molécule possédant de puissants pouvoirs de modulation immunitaire.

En respect avec l'objectif principal qui était de déterminer les mécanismes d'induction de l'apoptose des neutrophiles, nous avons investigué l'activation de la voie de signalisation du stress du réticulum endoplasmique, la synthèse *de novo* des protéines, l'ubiquitination des protéines et l'activation des caspases. De plus, dans le but d'identifier les voies empruntées par la curcumine dans l'induction de l'apoptose des neutrophiles, nous avons étudié l'influence de la catalase et du GM-CSF. Nos résultats ont permis de valider les effets connus de la curcumine, mais ont aussi permis d'augmenter l'état des connaissances sur le sujet, par exemple au niveau de la phagocytose et de la dégranulation des neutrophiles. En conclusion, nous pouvons affirmer que la curcumine exerce des effets proapoptotiques sur les neutrophiles humains. L'induction de l'apoptose des neutrophiles par la curcumine pourrait expliquer une grande partie des effets anti-inflammatoires de la curcumine.

Les neutrophiles possèdent aussi la capacité d'exercer plusieurs fonctions cellulaires et ce, grâce à leur physiologie particulière et unique. Or, la littérature scientifique concernant les effets de la curcumine sur la physiologie des neutrophiles n'est que fragmentaire. Or, nous avons démontré que cette dernière inhibe la production des réactifs oxygénés, la sécrétion des cytokines et des chimiokines et l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Aussi, la curcumine semble posséder une double fonction sur le mécanisme de sécrétion d'IL-8. De plus, nous avons montré que la curcumine provoque la dégranulation des trois types principaux de granules des neutrophiles. Ces résultats confirment que la curcumine possède des activités immunomodulatrices, notamment en ciblant la physiologie des neutrophiles.

Finalement, nous avons pu confirmer les effets de la curcumine observés *in vitro* à l'aide d'un modèle inflammatoire *in vivo*. En respect avec le troisième objectif qui était d'évaluer l'effet de la curcumine sur l'infiltration leucocytaire dans le modèle murin de la poche d'air, nous avons pu confirmer que la curcumine inhibe la migration des neutrophiles au site inflammatoire. Nous avons même pu déterminer que la voie i.p. est plus efficace qu'une voie locale, directement dans la poche d'air. La biodisponibilité de la curcumine semble être le défi majeur concernant l'utilisation de cette dernière en thérapie.

La curcumine fait aujourd'hui l'objet de nombreuses études sur le cancer et sur les maladies neurodégénératives. Ses effets anticancéreux et neuroprotecteurs ne seraient peut-être que le résultat de ses effets sur l'inflammation car il est connu que le cancer et les maladies neurodégénératives sont accompagnées d'inflammation chronique, d'où la pertinence du présent projet de recherche. Par contre, la faible biodisponibilité de la curcumine pourrait limiter *de facto* son utilisation potentielle pour traiter les affections

inflammatoires. Malgré tout, la curcumine fait l'objet de plusieurs études cliniques, notamment pour traiter les cancers colorectaux. Aussi, la curcumine présenterait un rôle protecteur pour le système cardiovasculaire, notamment à cause de son habileté à influencer le métabolisme des lipides, entre autres.

La curcumine présente un potentiel pour la prévention et le traitement des maladies inflammatoires chroniques. Malgré cela, encore beaucoup de travail se doit d'être effectuer pour pleinement comprendre les mécanismes utilisés par cette molécule chez les neutrophiles. *A posteriori*, nous espérons que nos travaux de recherches aideront à améliorer notre compréhension concernant les effets de la curcumine sur la physiologie des neutrophiles et à stimuler davantage les recherches dans ce domaine.

L'étude de la physiologie des neutrophiles est une voie de recherche pertinente pour aider à la compréhension des processus anti-inflammatoires de la curcumine, mais aussi de toute autre molécule possédant des propriétés anti-inflammatoires. L'avenue de recherche spécifique de l'interaction curcumine/neutrophiles étant encore pratiquement inexplorée, chacune des expériences réalisées à l'intérieur de ce projet de recherche a contribué à l'avancement des connaissances à ce sujet.

Aujourd'hui, les stratégies thérapeutiques pour traiter les maladies inflammatoires sont développées dans l'optique d'enrayer des processus inflammatoires naturels souvent associés à la physiologie des neutrophiles. Le problème avec cette stratégie c'est qu'elle ne tient pas compte de la primordialité de la réponse inflammatoire pour la santé d'un individu. L'inflammation est parmi la première muraille du système immunitaire. Elle est essentielle pour le contrôle des infections et est l'instrument par lequel le processus de cicatrisation se met en place. Il est donc normal de penser que d'inhiber ces processus

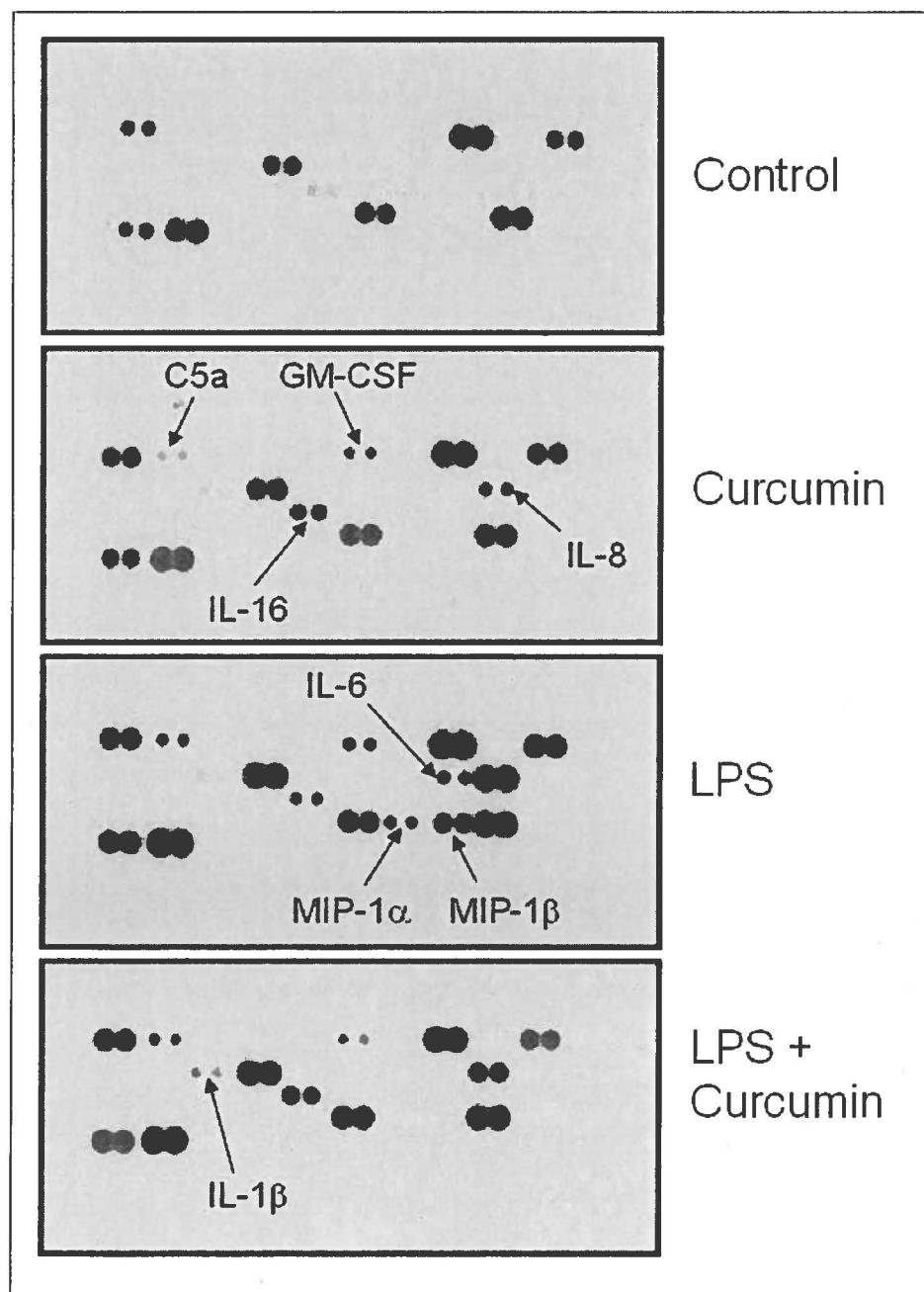
physiologiques résulterait en une réponse inflammatoire incomplète, un manque de cicatrisation, et donc une inflammation chronique. Les traitements futurs devront être développés en considération de la physiologie des neutrophiles, et plus particulièrement leur apoptose.

Les traitements modernes essayent souvent de rétablir aux conditions normales les patients qui souffrent de ces déséquilibres physiologiques. Malheureusement, les thérapies actuelles ne sont pas dénuées d'effets secondaires pouvant altérer la physiologie normale des neutrophiles et engendrer de plus graves conséquences à long terme. Dans certains cas, les traitements pour les maladies inflammatoires chroniques sont souvent accompagnés d'effets secondaires pouvant nuire encore plus à la santé de l'individu. La curcumine est une molécule qui inhibe une vaste gamme de procédés et de voies de signalisations dans les cellules, mais son absence de toxicité lui donne un avantage certain sur la médication anti-inflammatoire actuelle.

Les effets proapoptotiques et activateur de la physiologie des neutrophiles, en combinaison avec l'inhibition du facteur de transcription NF-κB, fait de la curcumine un candidat de choix pour faire partie de l'élite des molécules possédant les plus puissants effets anti-inflammatoires.

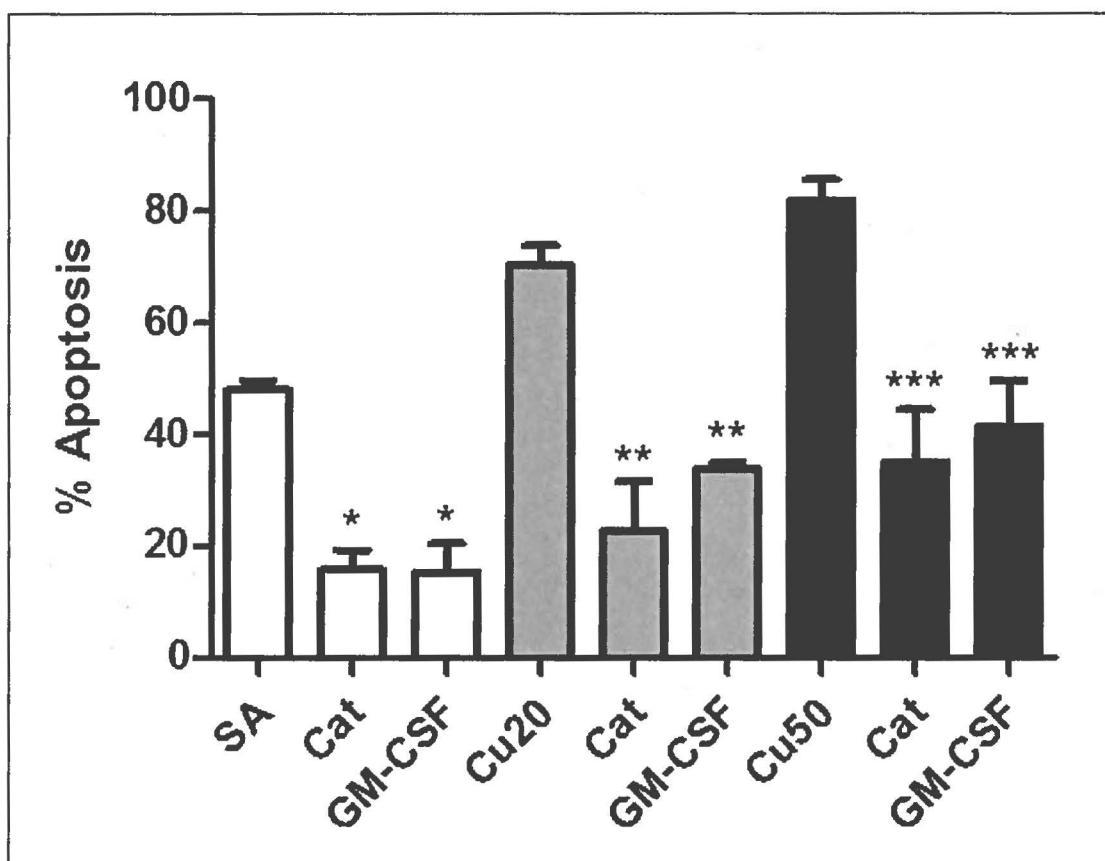
ANNEXES

Annexe I :



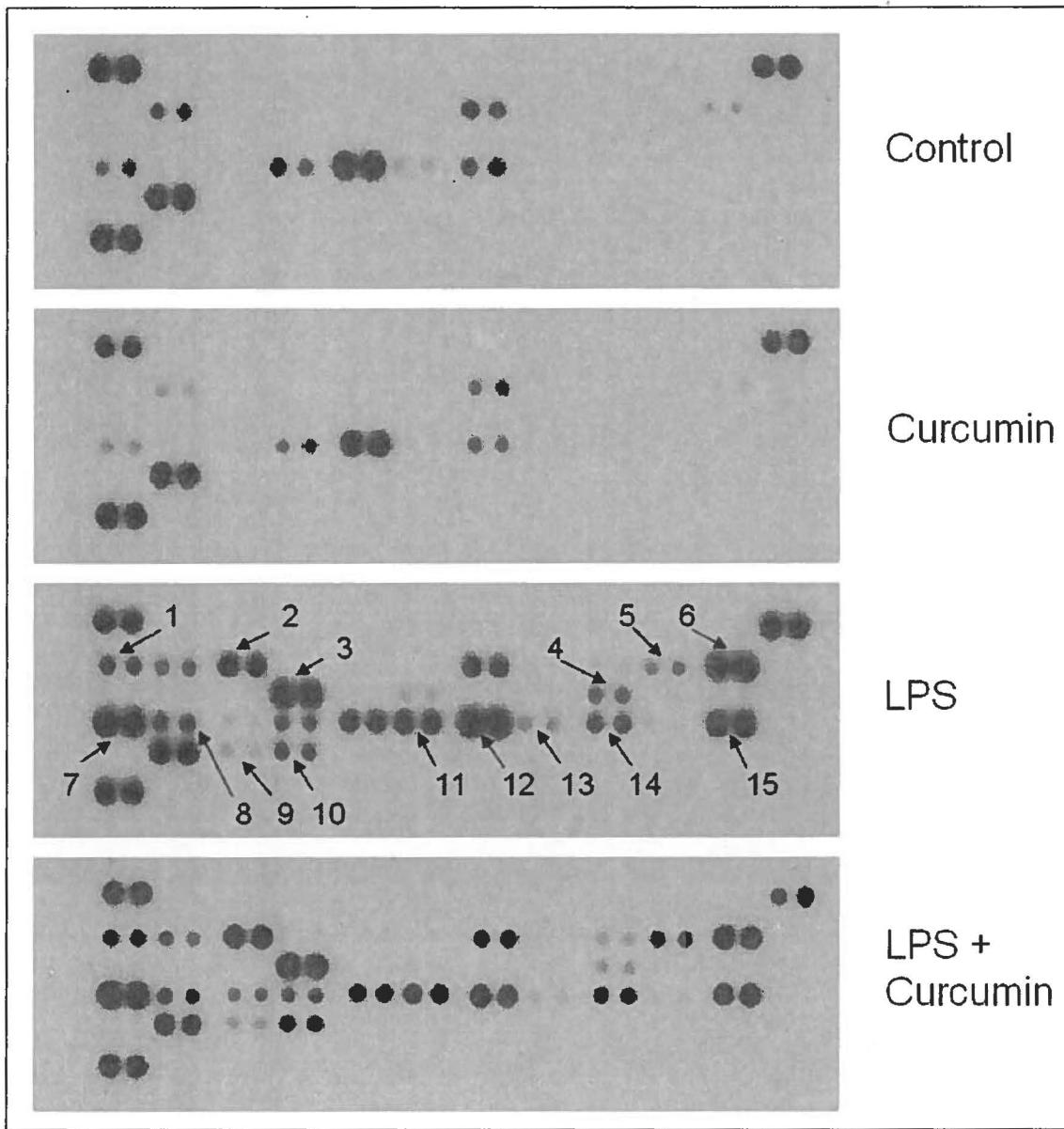
Sécrétion des cytokines et des chimiokines par les neutrophiles. Les cellules (10×10^6 cellules/ml RPMI supplémenté avec 10% serum autologue) ont été traitées pendant 6 h avec le diluant (Control) ou 50 μ M curcumine ou 1 μ g/ml LPS ou une combinaison de curcumine et de LPS (LPS + Curcumin). Les surnageants ont été récoltés et combinés ($n = 8$) puis analysés par une approche par microréseaux d'anticorps (Human cytokine Proteome profiler™ panel A, R&D Systems Inc.). Les résultats montrent l'expression de près de 40 cytokines et chimiokines dans les surnageants des neutrophiles traités. L'expression des différentes cytokines et chimiokines a été analysée à l'aide du logiciel FluorChem HD2.

Annexe II :



L'apoptose induite ou spontanée des neutrophiles est affectée par la catalase et le GM-CSF. Les cellules (10×10^6 cellules/ml) ont été incubées pendant 24 h avec le diluent (SA), 20 ou 50 μ M curcumine avec 2000 U/ml de catalase ou 65 ng/ml de GM-CSF. L'apoptose des neutrophiles a été évaluée par cytologie telle que décrit dans la section *materials et methods* de l'article 1. ($9 \geq n \geq 3$) * $p < 0.05$ vs SA (Ctrl), ** $p < 0.05$ vs Cu20, *** $p < 0.05$ vs Cu50. SA: apoptose spontanée; Cat: catalase; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Annexe III :



Effets de la curcumine sur la sécrétion des cytokines *in vivo*. Les souris (Control, n = 11; LPS, n = 10; Curcumin, n = 12; LPS + Curcumin, n = 12) ont été prétraitées à l'aide d'une injection i.p. de 1 ml de HBSS (Control, LPS) ou de 1 ml de 50 µM Curcumine (Curcumin, LPS + Curcumin) pendant 30 m avant l'injection de 1 ml de 1 µg/ml de LPS (LPS, LPS + Curcumin) ou de 1 ml de HBSS (Control, Curcumin) dans la poche d'air durant 6 h. Les souris sont ensuite sacrifiées puis les exsudats sont récoltés pour l'analyse. Les surnageants ont été combinés puis analysés par une approche par microréseaux d'anticorps (Mouse cytokine Proteome profiler™ panel A, R&D Systems Inc.). Les résultats montrent l'expression de près de 40 cytokines et chimiokines dans les surnageants des souris traitées. L'expression des différentes cytokines et chimiokines a été analysée à l'aide du logiciel FluorChem HD2.

Légende : 1: BLC, 2: G-CSF, 3: IL-6, 4: IL-16, 5: IL-1β, 6: IL-1ra, 7: IP-10, 8: I-TAC, 9: TNF-α, 10: TREM-1, 11: MCP-5, 12: MIG, 13: MIP-1α, 14: MIP-1β, 15: RANTES.

Annexe IV :

Chapitre de livre / Nova Science Publishers

Curcumin: Synthesis, emerging role in pain management and health implications - Curcumin and inflammation: The role of neutrophils.

Curcumine: Synthèse, rôle émergeant dans la gestion de la douleur et implications sur la santé - Curcumine et inflammation: Le rôle des neutrophiles.

Francis Antoine¹ et Denis Girard¹

¹ Laboratoire de recherche en inflammation et physiologie des granulocytes, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Qc., Canada.

Le chapitre est présenté tel que publié dans le livre Curcumin : Synthesis, emerging role in pain management and health implications de Nova Science Publishers. Le numéro des figures a été changé pour suivre un décompte continu à travers le cours de la thèse.

Contribution : À titre de premier auteur, j'ai participé à la rédaction de chaque section du manuscrit.

RÉSUMÉ

Le curcuma est un remède maison utilisé depuis des siècles. Il a été utilisé comme un médicament non toxique pour traiter une variété de troubles et de maladies inflammatoires et auto-immunes. Aujourd'hui, nous étudions ce composé nutraceutique, puisque la connaissance émergeant des laboratoires de recherche dans le monde confirme son action bénéfique sur la santé humaine. La curcumine est l'un des composés naturels le plus étudié, mais seulement très peu d'attention a été adressée à son interaction avec les neutrophiles, les leucocytes les plus abondants dans le sang humain. Les neutrophiles jouent un rôle clé en inflammation et sont impliqués dans l'initiation, la progression et le maintien de celle-ci lors de l'apparition de différentes pathologies. Les propriétés biologiques de la curcumine ont été classiquement attribuées à ses activités anti-inflammatoires et antioxydantes. Ce chapitre se concentrera sur les propriétés biologiques de la curcumine vers des cellules d'origine myéloïde, en particulier sur les neutrophiles. La capacité de la curcumine pour moduler de nombreuses fonctions des neutrophiles pourrait être un effet central qui explique ses effets anti-inflammatoires. Nous discuterons également des effets de la curcumine principalement sur la production d'espèces réactives de l'oxygène, la modulation des cytokines et des facteurs de transcription et l'apoptose. Cibler les fonctions des neutrophiles afin de traiter ou de prévenir de nombreuses maladies inflammatoires est maintenant une idée émergente qui a conquis de nombreux scientifiques. Par conséquent, l'utilisation de la curcumine comme un agent immunomodulateur de la physiologie des neutrophiles est en train d'être pris en considération pour la prévention et le traitement des maladies inflammatoires.

Mots clés : curcumine, neutrophiles, inflammation

ABSTRACT

Turmeric is a useful household remedy since centuries. It has been used as a non-toxic drug to treat a variety of disorders and inflammatory and auto-immune diseases. Today, we are considering this compound a nutraceutical, since the knowledge emerging from research laboratories worldwide confirms its beneficial action on human health. Despite the fact that curcumin is one of the best studied natural compound, only minor attention has been addressed towards its interaction with neutrophils, the most abundant leukocytes in human blood and key players in inflammation. Neutrophils are involved in the initiation, the progression and the sustainment of the inflammation during the onset of different pathologies. The biological properties of curcumin have been classically attributed to its anti-inflammatory and antioxidant activities. This chapter will focus on the biological properties of curcumin towards cells of myeloid origin, especially on neutrophil cells. The ability of curcumin to modulate many functions of neutrophils might be a central fact that explains its anti-inflammatory effects. We will also discuss the properties of curcumin mostly on the production of reactive oxygen species, the modulation of cytokines and transcription factors and apoptosis. Targeting neutrophils functions in order to treat or to prevent many inflammatory disorders is now an emerging idea that has conquered many scientists. Therefore, the use of curcumin as an immunomodulating agent of the physiology of neutrophils is beginning to be considered for the prevention and the treatment of inflammatory diseases.

Keywords: Curcumin, neutrophils, inflammation

INTRODUCTION

Inflammation is the term employed to describe the response of tissue to harmful stimuli and an inflammatory response is a series of events coordinated in a predictable sequence. Each cells of the immune system, and the connective tissue, play a specific role in the different stages of the inflammatory response. The goal of inflammation is the restoration of normal tissue architecture and function.

Dysregulation of inflammation could be a major problem in human health. Chronic inflammation can last for months or years and can result from a failure in resorbing acute inflammation, an autoimmune response to a self-antigen or a persistent chronic irritant of low intensity. During chronic inflammation, the immune system is either mistaken or consistently challenged by chronic stress.

Today, the lifestyle is often considered as a major input in the inflammatory load that an individual could suffer. Stress, pollution, motionlessness and imbalanced diet are often pointed as key parameters regulating the immune homeostasis of an individual. The environmental exposition to contaminants on a daily basis (from the working or the living environment or from the food and water ingested) may alter the beneficial functions of the immune system known to protect the organism against foreign material of potential harmfulness. In human health, we are now dealing with increasing numbers of immune disorders suspected to be triggered by the lifestyles. For example, chronic inflammation would be the result of the chronic exposures to agents provided by the environment surrounding an individual during the lifetime.

Neutrophils are phagocytes and in humans, are the most abundant type of white blood cells (up to 75% of all leukocytes). They form a large part of the innate immune system, playing a first role in inflammation. They possess granules which contain preformed inflammatory mediators and proteolytic enzymes (Akgul *et al.*, 2001) and produce large amounts of reactive oxygen species (ROS) (Borregaard, 2010).

Curcumin is a natural compound being thoroughly studied for its anti-inflammatory properties. However, despite the important role of neutrophils in inflammation, it is curious that the role of curcumin on neutrophil biology is poorly understood. Because of that, we have recently performed a series of experiments in order to document the interaction between curcumin and neutrophils. The following chapter presents the modulatory effects of curcumin on the principal biological functions of neutrophils. In this chapter, the effects of curcumin on the production of reactive oxygen species, the modulation of transcription factors and cytokines, the induction of apoptosis, and also phagocytosis and degranulation, are summarized.

HOW TO REGULATE INFLAMMATION?

Inflammation is a normal response to tissue injury. It is a series of cellular actions that take place acutely in response to a variety of stimulus. Anything that damages cells or tissues to the point of necrosis causes an inflammatory response. Also, it can be the result of infection, trauma, ischemia, chemical injury, radiation, etc (Harris *et al.*, 1995).

Clinically, the five cardinal signs of inflammation are: heat (*calor*), redness (*rubor*), swelling (*tumor*), pain (*dolor*) and ultimately, loss of tissue function (*functio laesa*). A

complete acute inflammatory response develops over a period from a few seconds to a few hours, and has three components: vascular dilation, increased vascular permeability, and neutrophils activation and migration in the tissue. Redness and heat are the result of increased blood flow to the inflamed site, swelling is caused by the accumulation of fluid, and pain is due to release of chemicals that stimulate nerve ending (Ferrero-Miliani *et al.*, 2007). Loss of function has multiple causes and is often a consequence of unresolved inflammation.

The inflammatory response is a prerequisite for our health but it ought to be effectively extinguished to prevent collateral damage to tissues over time. A failure to do so results in chronic inflammation, and cellular destruction. According to the literature, the resolution of inflammation is achieved by different mechanisms, including (but not limited to) the production and release of transforming growth factor (TGF) beta from macrophages (Ashcroft, 1999), the production and release of IL-10 (Sato *et al.*, 1999), the production of anti-inflammatory lipoxines (Serhan, 2008), the downregulation of pro-inflammatory molecules (such as leukotrienes), the upregulation of anti-inflammatory molecules (such as Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) (Moll *et al.*, 2013), or soluble tumor necrosis factor receptor (TNFR) (Apostolaki *et al.*, 2010), the desensitization of receptors and the downregulation of their activity (Lombardi *et al.*, 2002), the cleavage of chemokines by matrix metalloproteinases (McQuibban *et al.*, 2000), and elimination of pro-inflammatory apoptotic cells (Greenhalgh, 1998).

Indeed, neutrophils are proinflammatory cells that must undergo spontaneous apoptosis to maintain normal health conditions. If these cells are activated continuously by their surrounding environment they could become resistant to apoptosis and achieve their physiological functions longer than they should during homeostasis, leading to

destruction of tissues and chronic inflammation. Apoptosis is a critical regulator of the potentially harmful neutrophils physiology. In fact, the apoptosis of neutrophils is one of the most crucial mechanism by which the inflammation is resolved. Apoptosis can be modulated by various agents. Activating the apoptosis of neutrophils has the advantage of targeting broad inflammatory processes without undesirable adverse effects that are classically associated with many patented anti-inflammatory therapies.

Nonetheless, acute inflammation usually resolves by mechanisms that have remained somewhat elusive (Serhan *et al.*, 2005). Emerging information now proposes that an active, coordinated program of resolution is initiated in the first few hours after an inflammatory response begins. Neutrophils, principally the first type of immune cells to migrate to the site of inflammation, play a first role in the instatement, the sustainment and the resolving of inflammation. For example, after entering tissues, neutrophils promote the switch of arachidonic acid-derived prostaglandins and leukotrienes to lipoxins, which trigger the cessation sequence. Neutrophil recruitment thus ceases and programmed death by apoptosis is engaged. Consequently, apoptotic neutrophils are eliminated by professional phagocytes, notably macrophages. This leads to neutrophil clearance and release of anti-inflammatory cytokines, including TGF- β and IL-10 (Serhan *et al.*, 2005).

The proinflammatory signalling pathways and cellular mechanisms that trigger the inflammatory response have become progressively well outlined. However, little is known about the mediators and mechanisms that cease inflammation. Recent knowledge reveal that the resolution of inflammation is an effective series of action controlled by endogenous mediators that suppress proinflammatory gene expression and cell trafficking, as well as induce inflammatory-cell apoptosis and phagocytosis,

which are essential elements of fruitful resolution (Lawrence *et al.*, 2002). Nowadays, the different strategies used to treat inflammatory disorders work specifically by inhibiting normal inflammatory components rather than stimulate anti-inflammatory mechanisms. In opposition with that point of view, targeting the induction of apoptosis of neutrophils might be considered as a novel strategy to treat or prevent autoimmune and inflammatory illnesses, potentially caused by their unregulated physiology towards their environment.

CURCUMIN AND THE PHYSIOLOGY OF NEUTROPHILS

Turmeric is obtained from the dried rhizome powder of *Curcuma longa* and is commonly used as a spice in curries, food additive, and as a dietary pigment. This product is well known and used since centuries in our kitchens. But regardless of gastronomic pleasures, turmeric has been used to treat various illnesses in the Indian subcontinent since the ancient times (Jagetia *et al.*, 2007). It has been used as a non-toxic drug in the Ayurveda to treat a variety of disorders, and inflammatory and auto-immune diseases (Gupta *et al.*, 2013). Today, we are increasingly considering this plant as a nutraceutical, due to the knowledge emerging from research laboratories worldwide confirming its beneficial actions on animal and human health.

From turmeric can be extracted a tiny polyphenol, and this molecule is considered to be responsible for the immunomodulatory activities of turmeric. This polyphenol, called curcumin has been a useful household remedy since centuries, but now increasing knowledge lead us to give a prior attention on this compound. Curcumin has been studied thoroughly on many models of autoimmune and inflammatory diseases, and now

the scientific community agrees on its beneficial property to resolve inflammation. Many have depicted its mechanisms of action, which will be discussed in the following sections. It is surprising to note that even if curcumin is one of the most studied natural compounds having anti-inflammatory activities, that only minor attention has been addressed on its effects on neutrophils, key player cells in inflammation.

Curcumin has been used to treat many human autoimmune and chronic inflammatory diseases, including type I diabetes (Babu *et al.*, 1995), arthritis (Moon *et al.*, 2010), psoriasis (Heng *et al.*, 2000), and inflammatory bowel diseases (Taylor *et al.*, 2011). Curcumin is, in fact, used as a general anti-inflammatory agent, but its precise mechanism of action is not completely understood. There are many molecular targets of curcumin, including transcription factors, enzymes, growth factors, anti-apoptotic proteins and inflammatory mediators (Aggarwal *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2011). Curcumin exerts antioxidant, antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antiproliferative and proapoptotic effects (Aggarwal *et al.*, 2009).

PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES

The biological activities of curcumin have been classically attributed to its antioxidant property. Oxidative damage caused by oxygen free radicals from activated phagocytes contributes to, for example, to the pathology of arthritis. When compared to healthy subjects, rheumatic patients have an increase in phagocytic superoxide production (Miesel *et al.*, 1996). Also, given the fact that neutrophils are the most abundant immune cells in the blood circulation, their excessive activation could lead to atherosclerosis. Activation of the NADPH oxidase seems to be responsible of the elevated superoxide

levels initiating lesions in atherosclerosis (Kinkade *et al.*, 2013). Thus, the inhibition of the NADPH oxidase at the transcription level could attenuate the initiation and the progression of arthritis and/or atherosclerosis.

Recently, we demonstrated that curcumin drastically abrogated the production of ROS by human neutrophils following their stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (F. Antoine *et al.*, 2013b). PMA is known as a strong inducer of the NADPH oxidase in neutrophils and is frequently used as a positive control (Lehrer *et al.*, 1981) stimulating the production of superoxide (O_2^-) (Suzuki *et al.*, 1980). Indeed, PMA induced the production of large quantities of ROS compare to untreated neutrophils. These observations support further the antioxidant property of curcumin at a molecular level. Another group of research has shown that curcumin interfere with the assembly of the NADPH oxidase of neutrophils and human promyelocytic HL-60 cells *in vitro* (Derochette *et al.*, 2013). They showed that new water soluble form of curcumin (NDS27) inhibited both intra- and extracellular ROS production and this was more prominent in mature neutrophils than in immature HL-60 cells. These results suggested that the greater efficiency of NDS27 in neutrophils is due to an inhibitory effect on cells which are more active for ROS production, probably by targeting the enzymes involved in respiratory burst, like myeloperoxidase (MPO). Altogether, the results indicate that phagocytes are important therapeutic targets to control inflammatory events associated to ROS production (Derochette *et al.*, 2013).

The production of ROS by phagocytes is a major part of the inflammatory response. If not properly regulated, ROS are capable to perpetuate serious damage to the environing tissues and activate furthermore the inflammatory response. The sustainment of the inflammation caused by the presence of ROS can lead to autoimmune diseases,

including rheumatic arthritis and atherosclerosis (Kang *et al.*, Li *et al.*, 2012). Therefore, inhibiting the production of such neutrophils-derived molecules is relevant to prevent or to treat many chronic and painful disorders caused by the associated oxidative stress.

Conversely, the activity of the NADPH oxidase is required for a proper immune defense against foreign invaders. This enzyme is located in the membrane of the phagolysosome, and serves primarily to kill invading microbes and to digest them with the help of proteases during phagocytosis. The importance of this enzymatic complex is revealed by a hereditary disease called chronic granulomatous disease (CGD), where the phagocytic cells are unable to produce enough ROS via NADPH oxidase activation, allowing the invading pathogen to escape the immune defense (Chu *et al.*, 2013). This condition leads to recurrent infections due to the incapacity of the immune cells to clear the disease-causing organism. Thus, the theoretical inhibition of such an important enzymatic complex of the immune system and its associated problems must be considered when curcumin is used to prevent inflammatory disorders.

The inflammatory response and the oxidative stress can lead to neurodegenerative diseases. The transcription factor Nrf2 (NF-E2-related factor 2) is known to bind to the antioxidant responsive element (ARE). Nrf2 controls the basal and induced expression of an array of antioxidant response element-dependent genes to regulate the physiological and pathophysiological outcomes of oxidant exposures (Ma, 2013). The keap1/Nrf2 pathway is the major regulator of cytoprotective responses to oxidative and electrophilic stress (Kansanen *et al.*). Many studies clearly demonstrate that activation of Nrf2 target genes, and particularly HO-1, in astrocytes and neurons is strongly protective against inflammation, oxidative damage and cell death (Scapagnini *et al.*, 2011). Many consider the HO system to play a central role in the pathogenesis of neurodegenerative

disorders. In this regard, curcumin has been studied as a neuroprotective agent, protecting the neural cells against the inflammatory response and the oxidative stress caused by astrocytes (Scapagnini *et al.*, 2011). However, to the best of our knowledge, the role of curcumin towards the activation of Nrf2 in neutrophils has never been addressed. Nevertheless, the protective role that the activation of Nrf2 confers due to its associated antioxidants gene products may prevent the activation of the glial cells and the associated inflammation in neurodegenerative pathologies.

TRANSCRIPTION FACTORS AND CYTOKINES

Many transcription factors are known to be modulated by curcumin, including AP-1, Nrf2, PPAR- γ , and NF- κ B (Aggarwal *et al.*, 2009). These transcription factors play important roles in the control of the signal transduction of inflammation, cell growth, apoptosis, stress response and many other physiological functions. NF- κ B is an ubiquitous transcription factor of the immune system and influences both innate and adaptive immunity by regulating the expression of numerous cytokines and chemokines. More specifically, NF- κ B promotes survival and inflammation by the resulting gene products associated with its activation. In neutrophils, the regulation of cytokines and chemokines largely depends on transcriptional activators such as NF- κ B and C/EBP factors (Mayer *et al.*, 2013). The ability of curcumin to alter the redox status of the cells has been linked to its molecular structure (Toda *et al.*, 1985), but also to its capacity to modulate several enzymes and redox-sensitive transcriptional factors. For instance, it has been demonstrated that curcumin alleviates oxidative stress by modulating the Nrf2/keap1 pathway (Soetikno *et al.*, 2013). Many enzymes are under the control of redox-sensitive transcriptional factors.

The presence of cytokines has been linked to the pathogenesis of many inflammatory disorders. Targeting the activation of transcription factors responsible for the production of proinflammatory cytokines is of great importance in the treatment of pathologies associated with immunological disorders. The inhibition of the secretion of cytokines and chemokines can prevent the migration of neutrophils in the tissues. Following injuries, infections, chemical exposures, and some cancers, neutrophils exit the bloodstream, by a mechanism called extravasation, and migrate inside the tissue following a chemoattractant gradient of inflammatory mediators. This process, chemotaxis, is initiated by chemical signals provided by molecules such as IL-8, C5a, fMLP, and LT β 4, to name a few. Once arrived to the site, neutrophils exert their anti-microbial functions being highly motile, ingesting (phagocytosis) foreign microorganisms, and releasing cytokines and mediators to amplify the inflammatory response and to attract more cells to the site of inflammation. The chronic exposure to cytokines and chemokines sustains the activation of neutrophils and exacerbates their lifespan and inflammatory functions.

NF- κ B plays a central role in orchestrating the inflammatory response. The activation of this redox sensitive transcription factor is involved in the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by myeloid cells such as neutrophils and peripheral blood mononuclear cells (Antoine *et al.*, 2013b, Simard *et al.*, 2013, Stegmaier *et al.*, 2008). The activation of NF- κ B is ROS-dependent and is responsible for the secretion of IL-6, IL-8 and IL-1 β (Simard *et al.*, 2013). These cytokines have powerful chemoattractant effect towards neutrophils. For example, chronic pulmonary inflammation in the lung of patients affected with cystic fibrosis is characterized by massive intra-bronchial infiltrates

of neutrophils and this process is a direct consequence of the secretion of IL-6 and IL-8 by the bronchial cells (Cabrinii *et al.*, 2010).

It has been recently demonstrated that curcumin inhibits the LPS-induced translocation of NF- κ B in human neutrophils (Antoine *et al.*, 2013b). The ability of curcumin to inhibit activation of NF- κ B was associated with the inhibition of the secretion of IL-6, IL-8, MIP-1 α , and MIP-1 β principally. The antibody array approach used to assess the secretion of cytokines by neutrophils in inflammatory conditions (LPS) was confirmed by ELISA regarding the production of IL-8 and it appears that curcumin possess a dual activity on the secretion of IL-8. Curcumin inhibits most of the LPS-induced IL-8 secretion, but induces by itself (when neutrophils were treated with curcumin alone) a significant secretion of IL-8. This phenomenon is very important to consider regarding the effects of curcumin on neutrophils. To further confirm the results, *in vivo* experiments using the murine air pouch model of acute inflammation were conducted and it has been demonstrated that curcumin (i.p. injection) reduces the number of cells that are attracted to the site of inflammation (air pouch). However, curcumin was unable to inhibit the secretion of cytokines *in vivo* as compare to *in vitro* experiments using isolated human neutrophils showing the limited effect of curcumin inside the organism (F. Antoine *et al.*, 2013b). Interestingly, curcumin was still able to reduce the infiltration of cells in the tissues. Another study described that curcumin inhibited the motility of neutrophils by the inhibition of the secretion of chemokines, including KC, MIP-1 α , and MIP-2 by macrophages and colonic epithelial cells (Larmonier *et al.*, 2011). Others showed that curcumin blocks the chemotaxis of neutrophils by inhibiting signal transduction through IL-8 receptors (Takahashi *et al.*, 2007). Taken together, these results indicate that IL-8, and its associated transduction signal, appear to be highly modulated by curcumin.

Given that IL-8 is one of the most potent chemoattractants of neutrophils, the modulating effect of curcumin on the secretion and the signal transduction of IL-8 might explain its anti-inflammatory properties.

APOPTOSIS

Typically, differentiated circulating neutrophils undergo either spontaneous apoptosis (Summers *et al.*, 2010) or migrate into inflamed tissues (Witko-Sarsat *et al.*, 2000). Their activities are potentiated by host-derived factors and pathogens-derived products which approximately double their lifespan by inhibition of apoptosis (Colotta *et al.*, 1992, Witko-Sarsat *et al.*, 2011). The engulfment of apoptotic neutrophils by professional phagocytes during inflammation is indispensable for maintaining and/or retrieving the functions of the tissues during the resolution phase of the inflammatory process (Savill *et al.*, 2000). Defective apoptotic processes is involved in a large variety of diseases. The huge daily turnover of human neutrophils ($\sim 10^9$ cells/kg body weight) is a firmly controlled process (Summers *et al.*, 2010). It is well accepted that neutrophils survive for 8 hours after release into the peripheral circulation from the bone marrow (N. Borregaard, 2010). In opposition to this assumption, experiments using *in vivo* deuterium-labelled water ($^2\text{H}_2\text{O}$) suggest that the circulating neutrophil half-life is ~ 90 hours (Pillay *et al.*, 2010). However, such an extended circulating lifespan of non-activated neutrophils under homeostatic conditions needs to be more precisely analysed at the molecular level and opens new schemes for neutrophils during immune homeostasis (Pillay *et al.*, 2010).

Given their ability to produce powerful antimicrobial peptides, proteolytic enzymes and ROS (N. Borregaard, 2010), neutrophils must be tightly regulated. A very efficient and

non-inflammatory way to achieve the regulation of these cells is via the induction of apoptosis. It is well-known that neutrophils do not proliferate and have a short lifespan, but the exact mechanism of the neutrophil cell death is context-dependent; it can include apoptosis, necrosis, pyroptosis, oncosis, NETosis, phagocytosis-induced cell death (PICD) (Kennedy *et al.*, 2009) and autophagy (Mitroulis *et al.*, 2010, Witko-Sarsat *et al.*, 2011).

Apoptosis seems to be the major cell death type occurring upon curcumin exposition. The modulation of cell signalling pathways and the activation of cell death signals seem to play a major role in the pleiotropic effects of curcumin in inflammation and cancer, thereby inhibiting the progression of the disease. Curcumin induced apoptosis in cancer cell lines (Karmakar *et al.*, 2006, Pae *et al.*, 2007) and also in primary cells (F. Antoine *et al.*, 2013b, Hu *et al.*, 2005). Recently, curcumin has been found to increase constitutive or spontaneous neutrophil apoptosis and abrogated the transbilayer migration-induced delay in neutrophil apoptosis. In this study, the authors conclude that curcumin induced apoptosis and decreased migration and myeloperoxidase released by the activation of p38 MAPK and caspase-3 activity (Hu *et al.*, 2005). Treatment with the p38 specific inhibitor, SB203580, suppressed both curcumin-induced apoptosis and caspase-3 activation. Delayed neutrophil apoptosis has been associated with acute lung injury and sepsis (Ayala *et al.*, 2002, Taneja *et al.*, 2004). Apoptosis of circulating neutrophils from patients with clinical sepsis is profoundly suppressed through a mechanism that involves the activation of NF- κ B associated with reduced activity of caspase-9 and caspase-3 and the maintenance of the mitochondrial transmembrane potential, preventing the release of cytochrome c (Taneja *et al.*, 2004). In addition, ectopically expressed NF- κ B has been shown to abrogate curcumin-induced apoptosis (Anto *et al.*, 2000), revealing

the importance of NF- κ B in the induction of apoptosis by curcumin. In neutrophils, curcumin has been shown to inhibit the LPS-induced NF- κ B translocation (Antoine *et al.*, 2013b). Given the importance of the NF- κ B activation in inflammation, studying the modulating effect of curcumin on this mechanism in neutrophils is relevant to establish its use for a possible treatment in inflammatory disorders.

The upregulation of PPAR- γ seems to be another major mechanism of action in the induction of apoptosis by curcumin. Both *in vivo* and *in vitro* studies have shown that the activation of PPAR- γ has anti-inflammatory effects (Jiang *et al.*, 1998, Ricote *et al.*, 1998). PPAR- γ inhibits gene expression in part by antagonizing the activities of the transcription factors AP-1, STAT and NF- κ B (Ricote *et al.*, 1998). The activation of the PPAR- γ is thought to be conducted by the ERK1/2 MAP kinase pathway. Thereby, the anti-inflammatory effect of PPAR- γ would be the result of the physical interaction between the phosphorylated PPAR- γ and the p65 subunit of NF- κ B preventing its activation (Chen *et al.*, 2003) and its associated gene products. Furthermore, it has been shown that curcumin can preserve the level of PPAR- γ in rats subjected to sepsis by cecal ligation and puncture (CLP), a widely used animal model of sepsis. In this study, the upregulation of PPAR- γ activity by curcumin was seen at protein expression and mRNA levels during the induction of sepsis. Other *in vitro* experiments using RAW 264.7 cells demonstrated that curcumin increased the PPAR- γ mRNA levels (Siddiqui *et al.*, 2006). The MAP kinase pathway provides a potential regulatory mechanism for the physical interaction of PPAR- γ with the p65 subunit of NF- κ B (Chen *et al.*, 2003). However, whether the modulatory effect of curcumin on the apoptosis of neutrophils is dependent on PPAR- γ induction and its associated gene products need to be determined.

In cancer, the chemopreventive properties of curcumin have been attributed to the inhibition of transcription factors (NF- κ B, STAT3, β -catenin and AP-1), growth factors (EGF, PDGF and VEGF), enzymes (COX-2, iNOS and MMPs), kinases (Cyclin D1, CDKs, AKT, PKC and AMPK), inflammatory cytokines (TNF, MCP, IL-1 and IL-6), upregulation of proapoptotic (Bax, Bad and Bak) and downregulation of antiapoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-xL) (reviewed in (Shehzad *et al.*, 2013a). More specifically, the induction of apoptotic signalling cascade by curcumin is cell-dependent and mediated whether by the intrinsic, the extrinsic and/or the endoplasmic reticulum stress cell signalling pathways. For example, in pancreatic cancer cells, up-regulation of the extrinsic apoptosis by curcumin is mediated through the activation of TNFR, caspase-8, caspase-3, BID, BAX, and downregulation of NF- κ B, NDRG1, and BCL2L10 genes (Youns *et al.*, 2013). Also, curcumin was found to induce DNA damage and ER stress, leading to mitochondrial-dependent apoptosis through the activation of caspase-3 in human lung cancer A-549 cells (Lin *et al.*, 2008). In neutrophils, recent evidences suggest that curcumin activates the endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathway as judged by activation of eIF2 α and PERK, the inhibition of *de novo* protein synthesis and the decreased expression of chaperones (heat-shock protein 70 and 90) and polyubiquitylated proteins. However, the use of a pharmacological inhibitor of this pathway (salubrinal) failed to reverse the proapoptotic effect suggesting a minor role of this pathway in the induction of apoptosis by curcumin in human neutrophils (F. Antoine *et al.*, 2013b). Another study showed that the unfold protein response (UPR) is related to the induction of apoptosis in the human leukemia HL-60 cell line (myeloid precursor of neutrophils) by curcumin (Pae *et al.*, 2007). However, in neutrophils, the mechanisms responsible for the induction of apoptosis by curcumin are still under investigation.

CONCLUSION

Neutrophils have long been considered as simple suicide killers at the bottom of the hierarchy of the immune system. This view begins to change with the recent findings of the sophisticated mechanisms employed by these cells to seek for and find pathogens and regulate inflammation and the immune response (Mocsai, 2013). Curcumin seems to regulate many inflammatory signals transduction at the proteomic and genomic levels. This chapter has synthesized the recent findings regarding the effects of curcumin on the physiology and apoptosis of neutrophils. In fact, the capacity of curcumin to modulate the physiology and the apoptosis of neutrophils begins to be considered as prior mechanisms responsible for its anti-inflammatory properties. The table VI summarizes the immunomodulatory properties and the molecular targets of curcumin on neutrophils and HL-60 cells.

Table VI: Immunomodulatory effects and molecular targets of curcumin in neutrophils

Modulated functions or cellular process	Neutrophil primers	Molecular targets	References
Production of oxygen reactive species (ROS)	PMA	NADPH oxidase	[25], [28]
Secretion of cytokines	LPS	NF-κB IL-6, IL-8 MIP-1 α , MIP-1 β	[25]
Phagocytosis	Opsonized sheep red blood cells	unknown	
Degranulation	fMLP	CD35 (secretory) CD63 (azurophil) CD66b (gelatinase) MMP9	
Apoptosis	Spontaneous apoptosis fMLP-delayed LPS-delayed Transmigration across endothelium-epithelium bilayer	caspase-3 annexin-V CD16 lamin β 1 vimentin p38 caspase-3	[53], [68] [68] [68] [68] [68] [68] [53] [53]
Unfolded protein response	Endoplasmic-reticulum stress	eIF2 α PERK polyubiquitination <i>de novo</i> protein synthesis caspase-4 GRP78 CHOP	[51], [68] [51], [68] [68] [68] [51] [51] [51]

Mechanistic studies have not only established past uncertainty that curcumin uses numerous pathways to leave its signature on biological systems, but also warrants its potential use as a modern nontoxic chemotherapy for numerous disorders (Jagetia *et al.*, 2007). Basically, it appears that curcumin promote its therapeutic effects by inactivating

the nuclear transcription factor NF-κB, thus initiating a cascade of downstream inflammatory and immunogenic events. The inhibition of NF-κB by curcumin consecutively leads directly to the inhibition of expression of a number of proinflammatory cytokines (TNF, IL-1, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, MIP-1 α and MIP-1 β) and to the downregulation of several proinflammatory enzymes (COX, LOX, MMPs, and NOS) (F. Antoine *et al.*, 2013b, Jagetia *et al.*, 2007). In addition, the ability of curcumin to modulate the immunogenic response is further enhanced by its ability to inhibit pattern recognition receptors, including TLRs (Jeong *et al.*, 2011). Curcumin exerts proimmune activity in several autoimmune disorders including Alzheimer's disease, multiple sclerosis, cardiovascular disease, diabetes, allergy, asthma, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, renal ischemia, psoriasis and scleroderma. Overall, these findings suggest that curcumin warrants further consideration as a potential immunoregulatory treatment in various immune disorders (Jagetia *et al.*, 2007).

Presently, only a limited number of studies have investigated the pharmacokinetics properties of curcumin in humans. Taken orally, curcumin is well-tolerated by patients suffering malignant colorectal cancer. They are able to take doses up to 180 mg of curcumin per day without notable toxicity (Sharma *et al.*, 2001). When used orally, turmeric has been considered as an emmenagogue, diuretic, and carminative. It is also used topically to treat bruises, pains, sprains, boils, swellings, sinusitis, and various skin disorders (Jagetia *et al.*, 2007). The poultices prepared from turmeric are used for topical application to relieve pain and inflammation.

The inhibition of the infiltration of neutrophils to the site of inflammation by curcumin could be one logical explanation to the potent anti-inflammatory effects observed. For instance, inflammatory bowel diseases (IBD) are a result of neutrophil infiltration in the tissues associated with their protective functions. The inflammatory functions of neutrophils are regulated by numerous pathways, including apoptosis. Nowadays, the anti-inflammatory therapies based on the symptoms/diagnostic doctrine are designed to inhibit normal proinflammatory processes. The problem with this view is that it does not account for the primordial necessity of inflammation in human health. Inflammation is the barrier used to stop infections spreading the body; it is also the instrument by which the healing process is engaged. Thus, inhibiting this normal physiological process could lead to unresolved inflammation, lack of tissue healing and thus to chronic inflammation. The use of inhibitory-based anti-inflammatory therapies could lead to secondary immune problems over time. Anti-inflammatory therapies have to be reconsidered to focus more on activating biological processes that resolve inflammation, such as apoptosis. The Figure 28 illustrates the immunomodulation of curcumin on the physiology and the functions of neutrophils.

Concomitantly to its proapoptotic effects, curcumin has shown promising results for the inhibition of infiltration and proinflammatory functions of neutrophils associated with the destruction of tissues and chronic inflammation. The prevention and the treatment of inflammatory pathologies are a major concern in modern human health. Chronic inflammation is a major problem affecting a growing and aging population. It is the cause of many unwanted metabolic deficiencies and leads to chronic diseases requiring chronic medical attention.

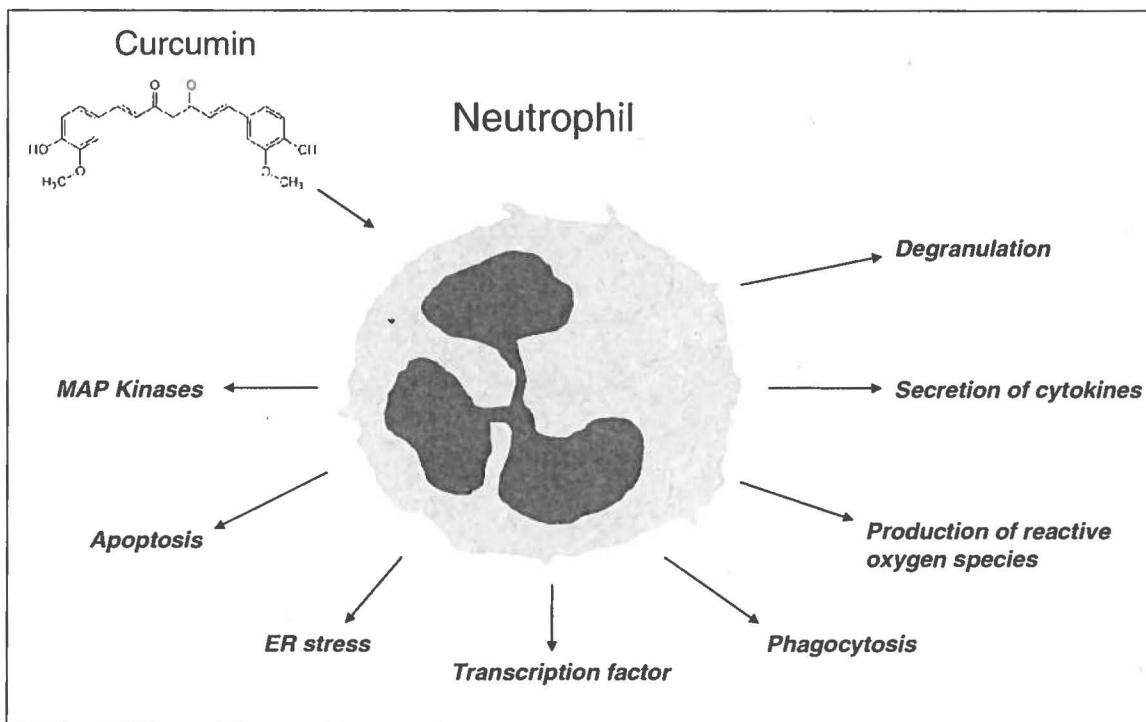


Figure 28: Immunomodulation of the functions and physiology of neutrophils.

Accumulating findings showed that curcumin does not seem to possess a specific mechanism of action towards inflammation but rather inhibits broad general processes. Taking in mind the recent scientific bandwagon that multi-targeted therapy is better than mono-targeted therapy for most diseases, curcumin can be considered as an ideal «spice for life» (Aggarwal *et al.*, 2007). Chemoprevention, as compared to conventional chemotherapies, represents one of the most highly effective anti-cancer strategies and is accompanied by minimal secondary effects. However, the concept of prevention has to be taken with precaution regarding inflammation because of the intrinsic necessity of this process in health.

Because the resolution of neutrophil-mediated inflammation mainly occurs through the induction of apoptosis, a failure in its regulation can lead to serious damage to the host

resulting in inflammatory diseases. Thus, inducing apoptosis of neutrophils by curcumin during inflammatory disorders (that often requires the sustaining activation of NF- κ B) must be viewed as a major target for the resolution of chronic inflammation. Not only does curcumin play a preventing role in inhibiting pro-inflammatory genes to be expressed (via NF- κ B inhibition), it also inhibits further inflammatory responses to happen by inducing apoptosis of the proinflammatory cells.

For now, recent researches have not studied the effects of curcumin on other innate immune system signal machinery such as the inflammasome. Other researches are needed to be conducted to further understand the role of this molecule on the physiology of neutrophils. For example, the role of curcumin in the phagocytosis and the degranulation processes of neutrophils have not been investigated. It is highly relevant to fully understand how curcumin can alter the biology of neutrophils to help developing or ameliorating therapeutic strategies.

RÉFÉRENCES

- Abe Y, Hashimoto S & Horie T (1999) Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res* 39(1,):41-47.
- Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N & Ichikawa H (2007) Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 595:, 1-75.
- Aggarwal BB & Sung B (2009) Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci* 30(2):85-94.
- Akgul C, Moulding DA & Edwards SW (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* 487(3):318-322.
- Akgul C, Moulding DA, White MR & Edwards SW (2000) In vivo localisation and stability of human McI-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Lett* 478(1-2):72-76.
- Amann R, Schuligoi R, Lanz I & Donnerer J (1995) Histamine-induced edema in the rat paw--effect of capsaicin denervation and a CGRP receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 279(2-3):227-231.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD & Zychlinsky A (2012) Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* 30:459-489.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA & Aggarwal BB (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 4(6):807-818.
- Andina N, Conus S, Schneider EM, Fey MF & Simon HU (2009) Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils. *Cell Death Differ* 16(9):1248-1255.
- Anto RJ, Maliekal TT & Karunagaran D (2000) L-929 cells harboring ectopically expressed RelA resist curcumin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275(21):15601-15604.
- Antoine F, Ennaciri J & Girard D (2010) Syk is a novel target of arsenic trioxide (ATO) and is involved in the toxic effect of ATO in human neutrophils. *Toxicol In Vitro* 24(3):936-941.
- Antoine F & Girard D (2013a) Mechanisms involved in curcumin-induced human neutrophil apoptosis: Evidence that curcumin activates the endoplasmic reticulum stress-induced cell apoptosis pathway. *SAGE Open Medicine* 1.
- Antoine F, Simard JC & Girard D (2013b) Curcumin inhibits agent-induced human neutrophil functions in vitro and lipopolysaccharide-induced neutrophilic infiltration in vivo. *Int Immunopharmacol* 17(4):1101-1107.
- Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P & Kollias G (2010) Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun* 11:1-26.
- Aratani Y, Miura N, Ohno N & Suzuki K (2012) [Role of neutrophil-derived reactive oxygen species in host defense and inflammation]. *Med Mycol J* 53(2):123-128.
- Arnaout MA (1993) Cell adhesion molecules in inflammation and thrombosis: status and prospects. *Am J Kidney Dis* 21(1):72-76.
- Ashcroft GS (1999) Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect* 1(15):1275-1282.
- Ayala A, Chung CS, Lomas JL, Song GY, Doughty LA, Gregory SH, Cioffi WG, LeBlanc BW, Reichner J, Simms HH & Grutkoski PS (2002) Shock-induced

- neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice: divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency. *Am J Pathol* 161(6):2283-2294.
- Babin K, Antoine F, Goncalves DM & Girard D (2013) TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol Lett* 221(1):57-63.
- Babu PS & Srinivasan K (1995) Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rat. *Mol Cell Biochem* 152(1):13-21.
- Baggiolini M (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250(2):91-104.
- Bainton DF & Farquhar MG (1968) Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes. I. Histochemical staining of bone marrow smears. *J Cell Biol* 39(2):286-298.
- Bainton DF, Ulyot JL & Farquhar MG (1971) The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J Exp Med* 134(4):907-934.
- Bakhshi J, Weinstein L, Poksay KS, Nishinaga B, Bredesen DE & Rao RV (2008) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in mouse melanoma cells: effect of curcumin. *Apoptosis* 13(7):904-914.
- Balunas MJ & Kinghorn AD (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* 78(5):431-441.
- Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B & Baggiolini M (1991) Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med* 173(3):771-774.
- Bechara C, Chai H, Lin PH, Yao Q & Chen C (2007) Growth related oncogene-alpha (GRO-alpha): roles in atherosclerosis, angiogenesis and other inflammatory conditions. *Med Sci Monit* 13(6):RA87-90.
- Beere HM (2005) Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest* 115(10):2633-2639.
- Berger F, Buchsler I & Munz B (2012) The effect of the NF-kappa B inhibitors curcumin and lactacystin on myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *Differentiation* 83(5):271-281.
- Binet F, Cavalli H, Moisan E & Girard D (2006) Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and de novo protein synthesis. *Br J Haematol* 132(3):349-358.
- Binet F, Chiasson S & Girard D (2010a) Arsenic trioxide induces endoplasmic reticulum stress-related events in neutrophils. *Int Immunopharmacol* 10(4):508-512.
- Binet F, Chiasson S & Girard D (2010b) Evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress and caspase-4 activation occur in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1):18-23.
- Binet F, Chiasson S & Girard D (2011) Interaction between arsenic trioxide (ATO) and human neutrophils. *Hum Exp Toxicol* 30(5):416-424.
- Binet F & Girard D (2008) Novel human neutrophil agonistic properties of arsenic trioxide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and/or c-jun NH₂-

- terminal MAPK but not extracellular signal-regulated kinases-1/2. *J Leukoc Biol* 84(6):1613-1622.
- Borregaard N (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33(5):657-670.
- Borregaard N & Cowland JB (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89(10):3503-3521.
- Borregaard N, Miller LJ & Springer TA (1987) Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. *Science* 237(4819):1204-1206.
- Borregaard N, Theilgaard-Monch K, Sorensen OE & Cowland JB (2001) Regulation of human neutrophil granule protein expression. *Curr Opin Hematol* 8(1):23-27.
- Bouchard A, Ratthe C & Girard D (2004) Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *J Leukoc Biol* 75(5):893-900.
- Boxer LA (2012) How to approach neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:174.
- Boyce M & Yuan J (2006) Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 13(3):363-373.
- Brechard S, Plancon S & Tschirhart EJ (2013) New insights into the regulation of neutrophil NADPH oxidase activity in the phagosome: a focus on the role of lipid and Ca(2+) signaling. *Antioxid Redox Signal* 18(6):661-676.
- Bright JJ (2007) Curcumin and autoimmune disease. *Adv Exp Med Biol* 595:425-451.
- Brinkmann V & Zychlinsky A (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 5(8):577-582.
- Broughton SE, Dhagat U, Hercus TR, Nero TL, Grimaldeston MA, Bonder CS, Lopez AF & Parker MW (2012) The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunol Rev* 250(1):277-302.
- Brown EJ (1992) Complement receptors, adhesion, and phagocytosis. *Infect Agents Dis* 1(2):63-70.
- Cabrini G, Bezzetti V, Mancini I, Nicolis E, Dechechi MC, Tamanini A, Lampronti I, Piccagli L, Bianchi N, Borgatti M & Gambari R (2010) Targeting transcription factor activity as a strategy to inhibit pro-inflammatory genes involved in cystic fibrosis: decoy oligonucleotides and low-molecular weight compounds. *Curr Med Chem* 17(35):4392-4404.
- Canfran-Duque A, Pastor O, Quintana-Portillo R, Lerma M, de la Pena G, Martin-Hidalgo A, Fernandez-Hernando C, Lasuncion MA & Bustos R (2013) Curcumin promotes exosomes/microvesicles secretion that attenuates lysosomal cholesterol traffic impairment. *Mol Nutr Food Res* 29(10):201300350.
- Cao A, Li Q, Yin P, Dong Y, Shi H, Wang L, Ji G, Xie J & Wu D (2013) Curcumin induces apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells and colon carcinoma HT-29 cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis* 18(11):1391-1402.
- Caruso RA, Fedele F, Finocchiaro G, Arena G & Venuti A (2012) Neutrophil-tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human tumors: an update and literature review. *Exp Oncol* 34(3):306-311.
- Cassatella MA (1995) The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16(1):21-26.

- Center DM, Kornfeld H & Cruikshank WW (1997) Interleukin-16. *Int J Biochem Cell Biol* 29(11):1231-1234.
- Cham BP, Gerrard JM & Bainton DF (1994) Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation. *Am J Pathol* 144(6):1369-1380.
- Chan MM (1995) Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol* 49(11):1551-1556.
- Chaudhuri J, Mitra S, Mukhopadhyay D, Chakraborty S & Chatterjee S (2012) Granulocyte Colony-stimulating Factor for Preterms with Sepsis and Neutropenia: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Neonatol* 1(4):202-206.
- Chen F, Wang M, O'Connor JP, He M, Tripathi T & Harrison LE (2003) Phosphorylation of PPARgamma via active ERK1/2 leads to its physical association with p65 and inhibition of NF-kappabeta. *J Cell Biochem* 90(4):732-744.
- Chu J, Song HH, Zaremba KA, Mills TA & Gallin JI (2013) Persistence of the Bacterial Pathogen Granulibacter bethesdensis in Chronic Granulomatous Disease Monocytes and Macrophages Lacking a Functional NADPH Oxidase. *J Immunol* 191(6):3297-3307.
- Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S & Mantovani A (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80(8):2012-2020.
- Cox DP & Weathers DR (2008) Leukocyte adhesion deficiency type 1: an important consideration in the clinical differential diagnosis of prepubertal periodontitis. A case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105(1):86-90.
- Cross A, Moots RJ & Edwards SW (2008) The dual effects of TNFalpha on neutrophil apoptosis are mediated via differential effects on expression of Mcl-1 and Bfl-1. *Blood* 111(2):878-884.
- Dale DC & Welte K (2011) Cyclic and chronic neutropenia. *Cancer Treat Res* 157:97-108.
- DeFranco A, Robertson M. (2007) *Immunity - The immune response in infectious and inflammatory disease*. Primers in Biology
- Derochette S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Ceusters J, Deby-Dupont G, Lejeune JP, Neven P & Serteyn D (2013) Curcumin and resveratrol act by different ways on NADPH oxidase activity and reactive oxygen species produced by equine neutrophils. *Chem Biol Interact* 206(2):186-193.
- Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C & Hogg N (1994) Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol* 153(3):1254-1263.
- Duffin R, Leitch AE, Fox S, Haslett C & Rossi AG (2010) Targeting granulocyte apoptosis: mechanisms, models, and therapies. *Immunol Rev* 236:28-40.
- Dzhagalov I, St John A & He YW (2007) The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages. *Blood* 109(4):1620-1626.
- Edwards JC, Sedgwick AD & Willoughby DA (1981) The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J Pathol* 134(2):147-156.

- Edwards SW, Derouet M, Howse M & Moots RJ (2004) Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1. *Biochem Soc Trans* 32(Pt 3):489-492.
- El Kebir D & Filep JG (2010) Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal* 10:1731-1748.
- Estensen RD, White JG & Holmes B (1974) Specific degranulation of human polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 248(446):347-348.
- Evans DP, Hossack M & Thomson DS (1971) Inhibition of contact sensitivity in the mouse by topical application of corticosteroids. *Br J Pharmacol* 43(2):403-408.
- Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A & Hogg N (2009) Integrins in immunity. *J Cell Sci* 122(Pt 2):215-225.
- Fan HC, Fernandez-Hernando C & Lai JH (2014) Protein kinase C isoforms in atherosclerosis: pro- or anti-inflammatory? *Biochem Pharmacol* 16(14):00030-00036.
- Faurschou M & Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5(14):1317-1327.
- Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J & Borregaard N (2002) Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta* 19:1-3.
- Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS & Girardin SE (2007) Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clinical & Experimental Immunology* 147(2):227-235.
- Filep JG & El Kebir D (2009) Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the resolution of inflammation. *J Cell Biochem* 108(5):1039-1046.
- Fischer A (2007) Human primary immunodeficiency diseases. *Immunity* 27(6):835-845.
- Fischer H, Koenig U, Eckhart L & Tschachler E (2002) Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 293(2):722-726.
- Forsberg M, Druid P, Zheng L, Stendahl O & Sarndahl E (2003) Activation of Rac2 and Cdc42 on Fc and complement receptor ligation in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 74(4):611-619.
- Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C & Rossi AG (2010) Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* 2(3):216-227.
- Fullerton JN, O'Brien AJ & Gilroy DW (2013) Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. *J Pathol* 231(1):8-20.
- Galluzzi L, Blomgren K & Kroemer G (2009) Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 10(7):481-494.
- Garcia-Garcia E & Rosales C (2002) Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 72(6):1092-1108.
- Gautam SC, Gao X & Dulchavsky S (2007) Immunomodulation by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595:321-341.
- Geering B & Simon HU (2011) Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ* 18(9):1457-1469.
- Geiser T, Dewald B, Ehrengruber MU, Clark-Lewis I & Baggolini M (1993) The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. *J Biol Chem* 268(21):15419-15424.

- Giagulli C, Ottoboni L, Caveggion E, Rossi B, Lowell C, Constantin G, Laudanna C & Berton G (2006) The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating beta 2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for beta 2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion. *J Immunol* 177(1):604-611.
- Ginsberg MH, Partridge A & Shattil SJ (2005) Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 17(5):509-516.
- Giri RK, Rajagopal V & Kalra VK (2004) Curcumin, the active constituent of turmeric, inhibits amyloid peptide-induced cytochemokine gene expression and CCR5-mediated chemotaxis of THP-1 monocytes by modulating early growth response-1 transcription factor. *J Neurochem* 91(5):1199-1210.
- Goncalves DM, Chiasson S & Girard D (2010) Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 24(3):1002-1008.
- Goncalves DM & Girard D (2011) Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *Int Immunopharmacol* 11(8):1109-1115.
- Gray RD, Lucas CD, Mackellar A, Li F, Hiersemelz K, Haslett C, Davidson DJ & Rossi AG (2013) Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. *J Inflamm* 10(1):1476-9255.
- Greenhalgh DG (1998) The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 30(9):1019-1030.
- Griswold DE, Martin LD, Badger AM, Breton J & Chabot-Fletcher M (1998) Evaluation of the cutaneous anti-inflammatory activity of azaspiranes. *Inflamm Res* 47(2):56-61.
- Grynkiewicz G & Slifirski P (2012) Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochim Pol* 59(2):201-212.
- Gupta SC, Sung B, Kim JH, Prasad S, Li S & Aggarwal BB (2013) Multitargeting by turmeric, the golden spice: From kitchen to clinic. *Mol Nutr Food Res* 57(9):1510-1528.
- Hager M, Cowland JB & Borregaard N (2010) Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med* 268(1):25-34.
- Hallett JM, Leitch AE, Riley NA, Duffin R, Haslett C & Rossi AG (2008) Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 29(5):250-257.
- Harding HP, Zhang Y & Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397(6716):271-274.
- Harris BH & Gelfand JA (1995) The immune response to trauma. *Semin Pediatr Surg* 4(2):77-82.
- Hasan ST, Zingg JM, Kwan P, Noble T, Smith D & Meydani M (2014) Curcumin modulation of high fat diet-induced atherosclerosis and steatohepatosis in LDL receptor deficient mice. *Atherosclerosis* 232(1):40-51.
- Heng MC, Song MK, Harker J & Heng MK (2000) Drug-induced suppression of phosphorylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. *Br J Dermatol* 143(5):937-949.

- Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(2):89-102.
- Hetz C, Chevet E & Harding HP (2013) Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* 12(9):703-719.
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y & Tohyama M (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165(3):347-356.
- Hoffstein ST, Friedman RS & Weissmann G (1982) Degranulation, membrane addition, and shape change during chemotactic factor-induced aggregation of human neutrophils. *J Cell Biol* 95(1):234-241.
- Hogg N, Henderson R, Leitinger B, McDowall A, Porter J & Stanley P (2002) Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol Rev* 186:164-171.
- Holland SM (2013) Chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 27(1):89-99.
- Hopkins PN (2013) Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev* 93(3):1317-1542.
- Hu M, Du Q, Vancurova I, Lin X, Miller EJ, Simms HH & Wang P (2005) Proapoptotic effect of curcumin on human neutrophils: activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Crit Care Med* 33(11):2571-2578.
- Hutt D & Balch WE (2010) Cell Biology. The proteome in balance. *Science* 329(5993):766-767.
- Ip SW, Wu SY, Yu CC, Kuo CL, Yu CS, Yang JS, Lin ZP, Chiou SM, Chung HK, Ho HC & Chung JG (2011) Induction of apoptotic death by curcumin in human tongue squamous cell carcinoma SCC-4 cells is mediated through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways. *Cell Biochem Funct* 29(8):641-650.
- Ireson C, Orr S, Jones DJ, Verschoyle R, Lim CK, Luo JL, Howells L, Plummer S, Jukes R, Williams M, Steward WP & Gescher A (2001) Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat *in vivo*, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res* 61(3):1058-1064.
- Jagetia GC & Aggarwal BB (2007) "Spicing up" of the immune system by curcumin. *J Clin Immunol* 27(1):19-35.
- Jeong E & Lee JY (2011) Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J* 52(3):379-392.
- Jiang C, Ting AT & Seed B (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391(6662):82-86.
- Johnson JL (2012) Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim Biophys Acta* 3:607-613.
- Johnson Z, Schwarz M, Power CA, Wells TN & Proudfoot AE (2005) Multi-faceted strategies to combat disease by interference with the chemokine system. *Trends Immunol* 26(5):268-274.
- Jurenka JS (2009) Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of Curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev* 14(2):141-153.

- Kang DH & Kang SW (*Targeting Cellular Antioxidant Enzymes for Treating Atherosclerotic Vascular Disease*. Biomol Ther (Seoul). 2013 Mar;21(2):89-96., Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H & Levonen AL (*The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer*. Redox Biol. 2013 Jan 18;1(1):45-49.,
- Karmakar S, Banik NL, Patel SJ & Ray SK (2006) Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Neurosci Lett* 407(1):53-58.
- Katano M, Okamoto K, Suematsu N, Kurokawa MS, Nakamura H, Masuko K, Yudoh K & Kato T (2011) Increased expression of S100 calcium binding protein A8 in GM-CSF-stimulated neutrophils leads to the increased expressions of IL-8 and IL-16. *Clin Exp Rheumatol* 29(5):768-775.
- Kennedy AD & DeLeo FR (2009) Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res* 43(1-3):25-61.
- Kim HJ, Hawke N & Baldwin AS (2006) NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 13(5):738-747.
- Kinkade K, Streeter J & Miller FJ (2013) Inhibition of NADPH oxidase by apocynin attenuates progression of atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 14(8):17017-17028.
- Kjeldsen L, Bjerrum OW, Askaa J & Borregaard N (1992) Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem J* 287(Pt 2):603-610.
- Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC & Nauseef WM (2013) Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* 93(2):185-198.
- Kostmann R (1956) Infantile genetic agranulocytosis; agranulocytosis infantilis hereditaria. *Acta Paediatr Suppl* 45(Suppl 105):1-78.
- Kroemer G, Galluzzi L & Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87(1):99-163.
- Kumar V & Sharma A (2010) Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol* 10(11):1325-1334.
- Kuo CL, Wu SY, Ip SW, Wu PP, Yu CS, Yang JS, Chen PY, Wu SH & Chung JG (2011) Apoptotic death in curcumin-treated NPC-TW 076 human nasopharyngeal carcinoma cells is mediated through the ROS, mitochondrial depolarization and caspase-3-dependent signaling responses. *Int J Oncol* 39(2):319-328.
- Lakshmanan U & Porter AG (2007) Caspase-4 interacts with TNF receptor-associated factor 6 and mediates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB-dependent production of IL-8 and CC chemokine ligand 4 (macrophage-inflammatory protein-1). *J Immunol* 179(12):8480-8490.
- Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4(3):181-189.
- Larmonier CB, Midura-Kiela MT, Ramalingam R, Laubitz D, Janikashvili N, Larmonier N, Ghishan FK & Kiela PR (2011) Modulation of neutrophil motility by curcumin: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 17(2):503-515.
- Lavastre V, Cavalli H, Ratthe C & Girard D (2004) Anti-inflammatory effect of Viscum album agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and

- inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation in vivo. *Clin Exp Immunol* 137(2):272-278.
- Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H & Girard D (2005) Viscum album agglutinin-I (VAA-I) induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins in human leukemia PLB-985 and X-CGD cells via caspases: lamin B1 is a novel target of VAA-I. *Leuk Res* 29(12):1443-1453.
- Lavastre V, Pelleter M, Saller R, Hostanska K & Girard D (2002) Mechanisms involved in spontaneous and Viscum album agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: Viscum album agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J Immunol* 168(3):1419-1427.
- Lawrence T, Willoughby DA & Gilroy DW (2002) Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2(10):787-795.
- Lehrer RI & Cohen L (1981) Receptor-mediated regulation of superoxide production in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate. *The Journal of Clinical Investigation* 68(5):1314-1320.
- Leuenroth SJ, Grutkoski PS, Ayala A & Simms HH (2000) The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J Leukoc Biol* 68(1):158-166.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI & Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7(9):678-689.
- Li D, Xie G & Wang W (2012) Reactive oxygen species: the 2-edged sword of osteoarthritis. *Am J Med Sci* 344(6):486-490.
- Lin SS, Huang HP, Yang JS, Wu JY, Hsia TC, Lin CC, Lin CW, Kuo CL, Gibson Wood W & Chung JG (2008) DNA damage and endoplasmic reticulum stress mediated curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A-549 cells through the activation caspases cascade- and mitochondrial-dependent pathway. *Cancer Lett* 272(1):77-90.
- Liu Z, Sun Y, Ren L, Huang Y, Cai Y, Weng Q, Shen X, Li X, Liang G & Wang Y (2013) Evaluation of a curcumin analog as an anti-cancer agent inducing ER stress-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer* 13(1):494.
- Logan-Smith MJ, Lockyer PJ, East JM & Lee AG (2001) Curcumin, a molecule that inhibits the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum but increases the rate of accumulation of Ca²⁺. *J Biol Chem* 276(50):46905-46911.
- Lombardi MS, Kavelaars A & Heijnen CJ (2002) Role and modulation of G protein-coupled receptor signaling in inflammatory processes. *Crit Rev Immunol* 22(2):141-163.
- Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B & Andrews DW (2008) Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135(6):1074-1084.
- Lugade AA, Bogner PN & Thanavala Y (2011) Murine model of chronic respiratory inflammation. *Adv Exp Med Biol* 780:125-141.
- Luo BH, Carman CV & Springer TA (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25:619-647.

- Ma Q (2013) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53:401-426.
- Manjunatha H & Srinivasan K (2006) Protective effect of dietary curcumin and capsaicin on induced oxidation of low-density lipoprotein, iron-induced hepatotoxicity and carrageenan-induced inflammation in experimental rats. *Febs J* 273(19):4528-4537.
- Marczylo TH, Verschoyle RD, Cooke DN, Morazzoni P, Steward WP & Gescher AJ (2007) Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer Chemother Pharmacol* 60(2):171-177.
- Mathias JR, Dodd ME, Walters KB, Rhodes J, Kanki JP, Look AT & Huttenlocher A (2007) Live imaging of chronic inflammation caused by mutation of zebrafish *Hai1*. *J Cell Sci* 120(Pt 19):3372-3383.
- Mathias JR, Perrin BJ, Liu TX, Kanki J, Look AT & Huttenlocher A (2006) Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *J Leukoc Biol* 80(6):1281-1288.
- May RC & Machesky LM (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114(Pt 6):1061-1077.
- Mayer TZ, Simard FA, Cloutier A, Vardhan H, Dubois CM & McDonald PP (2013) The p38-MSK1 Signaling Cascade Influences Cytokine Production through CREB and C/EBP Factors in Human Neutrophils. *J Immunol* 13:13.
- McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I & Overall CM (2000) Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289(5482):1202-1206.
- Metzler M, Pfeiffer E, Schulz SI & Dempe JS (2013) Curcumin uptake and metabolism. *Biofactors* 39(1):14-20.
- Miesel R, Hartung R & Kroeger H (1996) Priming of NADPH oxidase by tumor necrosis factor alpha in patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation* 20(4):427-438.
- Mirshafiey A & Mohsenzadegan M (2008) The role of reactive oxygen species in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 7(4):195-202.
- Mitroulis I, Kourtzelis I, Kambas K, Rafail S, Chrysanthopoulou A, Speletas M & Ritis K (2010) Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *Eur J Immunol* 40(5):1461-1472.
- Mocsai A (2013) Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* 210(7):1283-1299.
- Moll M & Kuemmerle-Deschner JB (2013) Inflammasome and cytokine blocking strategies in autoinflammatory disorders. *Clin Immunol* 147(3):242-275.
- Mollinedo F, Nakajima M, Llorens A, Barbosa E, Callejo S, Gajate C & Fabra A (1997) Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *Biochem J* 327(Pt 3):917-923.
- Moon DO, Kim MO, Choi YH, Park YM & Kim GY (2010) Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1 β -induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in mouse model. *Int Immunopharmacol* 10(5):605-610.

- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T & Yasuhiko Y (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277(37):34287-34294.
- Murray J, Barbara JA, Dunkley SA, Lopez AF, Van Ostade X, Condliffe AM, Dransfield I, Haslett C & Chilvers ER (1997) Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* 90(7):2772-2783.
- Nakagawa T & Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150(4):887-894.
- Newman DJ & Cragg GM (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70(3):461-477.
- Newman DJ, Cragg GM & Snader KM (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66(7):1022-1037.
- Nimmerjahn F & Ravetch JV (2008) Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8(1):34-47.
- Pae HO, Jeong SO, Jeong GS, Kim KM, Kim HS, Kim SA, Kim YC, Kang SD, Kim BN & Chung HT (2007) Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 353(4):1040-1045.
- Page AV & Liles WC (2011) Colony-stimulating factors in the prevention and management of infectious diseases. *Infect Dis Clin North Am* 25(4):803-817.
- Pelletier M, Bouchard A & Girard D (2004) In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* 173(12):7521-7530.
- Pelletier M, Roberge CJ, Gauthier M, Vandal K, Tessier PA & Girard D (2001) Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. *J Leukoc Biol* 70(3):367-373.
- Pellme S, Morgelin M, Tapper H, Mellqvist UH, Dahlgren C & Karlsson A (2006) Localization of human neutrophil interleukin-8 (CXCL-8) to organelle(s) distinct from the classical granules and secretory vesicles. *J Leukoc Biol* 79(3):564-573.
- Perretti M, Christian H, Wheller SK, Aiello I, Mugridge KG, Morris JF, Flower RJ & Goulding NJ (2000) Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophil and mobilized on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. *Cell Biol Int* 24(3):163-174.
- Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K & Koenderman L (2010) In vivo labeling with $^{2}\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116(4):625-627.
- Pozzan T, Lew DP, Wollheim CB & Tsien RY (1983) Is cytosolic ionized calcium regulating neutrophil activation? *Science* 221(4618):1413-1415.
- Rasheva VI & Domingos PM (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14(8):996-1007.
- Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB & Diederich M (2008) Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 76(11):1340-1351.

- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ & Glass CK (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391(6662):79-82.
- Romay C, Ledon N & Gonzalez R (1998) Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm Res* 47(8):334-338.
- Ron D & Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7):519-529.
- Roos D & Winterbourn CC (2002) Immunology. Lethal weapons. *Science* 296(5568):669-671.
- Rothman JE & Schekman R (2011) Molecular mechanism of protein folding in the cell. *Cell* 146(6):851-854.
- Ruggiano A, Foresti O & Carvalho P (2014) Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol* 204(6):869-879.
- Ryckman C, McColl SR, Vandal K, de Medicis R, Lussier A, Poubelle PE & Tessier PA (2003) Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. *Arthritis Rheum* 48(8):2310-2320.
- Saeki Y & Tanaka K (2012) Assembly and function of the proteasome. *Methods Mol Biol* 832:315-337.
- Sanz MJ & Kubes P (2012) Neutrophil-active chemokines in vivo imaging of neutrophil trafficking. *Eur J Immunol* 42(2):278-283.
- Sato Y, Ohshima T & Kondo T (1999) Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 265(1):194-199.
- Savill J & Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407(6805):784-788.
- Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D & Fabio G (2011) Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* 44(2):192-201.
- Scatizzi JC, Hutcheson J, Bickel E, Haines GK, 3rd & Perlman H (2007) Pro-apoptotic Bid is required for the resolution of the effector phase of inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* 9(3).
- Scheel-Toellner D, Wang K, Assi LK, Webb PR, Craddock RM, Salmon M & Lord JM (2004) Clustering of death receptors in lipid rafts initiates neutrophil spontaneous apoptosis. *Biochem Soc Trans* 32(Pt 5):679-681.
- Schroder M & Kaufman RJ (2005a) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569(1-2):29-63.
- Schroder M & Kaufman RJ (2005b) The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74:739-789.
- Selye H (1953) Use of granuloma pouch technic in the study of antiphlogistic corticoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 82(2):328-333.
- Sen S, Sharma H & Singh N (2005) Curcumin enhances Vinorelbine mediated apoptosis in NSCLC cells by the mitochondrial pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 331(4):1245-1252.

- Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C & Borregaard N (1995) Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol* 154(8):4157-4165.
- Sengelov H, Kjeldsen L & Borregaard N (1993a) Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* 150(4):1535-1543.
- Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA & Borregaard N (1993b) Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest* 92(3):1467-1476.
- Sengelov H, Kjeldsen L, Kroese W, Berger M & Borregaard N (1994) Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J Immunol* 153(2):804-810.
- Serhan CN (2008) Controlling the resolution of acute inflammation: a new genus of dual anti-inflammatory and proresolving mediators. *J Periodontol* 79(8 Suppl):1520-1526.
- Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG & Wallace JL (2007) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *Faseb J* 21(2):325-332.
- Serhan CN & Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6(12):1191-1197.
- Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, Pirmohamed M, Marnett LJ, Gescher AJ & Steward WP (2001) Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 7(7):1894-1900.
- Shehzad A & Lee YS (2013a) Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction. *Biofactors* 39(1):27-36.
- Shehzad A, Rehman G & Lee YS (2013b) Curcumin in inflammatory diseases. *Biofactors* 39(1):69-77.
- Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R & Srinivas PS (1998) Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 64(4):353-356.
- Siddiqui AM, Cui X, Wu R, Dong W, Zhou M, Hu M, Simms HH & Wang P (2006) The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Crit Care Med* 34(7):1874-1882.
- Simard JC, Cesaro A, Chapeton-Montes J, Tardif M, Antoine F, Girard D & Tessier PA (2013) S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1.). *PLoS One* 8(8):e0072138.
- Simard JC, Girard D & Tessier PA (2010) Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* 87(5):905-914.
- Simon HU, Haj-Yehia A & Levi-Schaffer F (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5(5):415-418.
- Soehnlein O, Weber C & Lindbom L (2009) Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol* 30(11):538-546.
- Soetikno V, Sari FR, Lakshmanan AP, Arumugam S, Harima M, Suzuki K, Kawachi H & Watanabe K (2013) Curcumin alleviates oxidative stress, inflammation, and

- renal fibrosis in remnant kidney through the Nrf2-keap1 pathway. *Mol Nutr Food Res* 57(9):1649-1659.
- Soltzberg J, Frischmann S, van Heeckeren C, Brown N, Caplan A & Bonfield TL (2011) Quantitative microscopy in murine models of lung inflammation. *Anal Quant Cytol Histol* 33(5):245-252.
- Stasia MJ & Li XJ (2008) Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin Immunopathol* 30(3):209-235.
- Stegmaier JC, Kirchhoff C, Bogner V, Matz M, Kanz KG, Mutschler W & Biberthaler P (2008) Dynamics of neutrophilic NF- κ B translocation in relation to IL-8 mRNA expression after major trauma. *Inflamm Res* 57(11):547-554.
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM & Chilvers ER (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31(8):318-324.
- Suzuki Y & Lehrer RI (1980) NAD(P)H oxidase activity in human neutrophils stimulated by phorbol myristate acetate. *J Clin Invest* 66(6):1409-1418.
- Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA & Koenderman L (2013) What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol* 94(4):595-601.
- Takahashi M, Ishiko T, Kamohara H, Hidaka H, Ikeda O, Ogawa M & Baba H (2007) Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) blocks the chemotaxis of neutrophils by inhibiting signal transduction through IL-8 receptors. *Mediators Inflamm* 10767:10767.
- Takikawa M, Kurimoto Y & Tsuda T (2013) Curcumin stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in GLUTag cells via Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activation. *Biochem Biophys Res Commun* 435(2):165-170.
- Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD & Marshall JC (2004) Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit Care Med* 32(7):1460-1469.
- Taylor RA & Leonard MC (2011) Curcumin for inflammatory bowel disease: a review of human studies. *Altern Med Rev* 16(2):152-156.
- Toda S, Miyase T, Arichi H, Tanizawa H & Takino Y (1985) Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of Curcuma longa L. *Chem Pharm Bull* 33(4):1725-1728.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(Pt 2):335-344.
- Van Cruchten S & Van Den Broeck W (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31(4):214-223.
- van de Laar L, Cofer PJ & Wolzman AM (2012) Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119(15):3383-3393.
- Villunger A, Scott C, Bouillet P & Strasser A (2003) Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival. *Blood* 101(6):2393-2400.
- Weinmann P, Gaehtgens P & Walzog B (1999) Bcl-XL- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3. *Blood* 93(9):3106-3115.

- Weitzman JB, Wells CE, Wright AH, Clark PA & Law SK (1991) The gene organisation of the human beta 2 integrin subunit (CD18). *FEBS Lett* 294(1-2):97-103.
- Winter CA, Risley EA & Nuss GW (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 111:544-547.
- Witko-Sarsat V, Pederzoli-Ribeil M, Hirsch E, Sozzani S & Cassatella MA (2011) Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol* 32(3):117-124.
- Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P & Halbwachs-Mecarelli L (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80(5):617-653.
- Wu SH, Hang LW, Yang JS, Chen HY, Lin HY, Chiang JH, Lu CC, Yang JL, Lai TY, Ko YC & Chung JG (2010) Curcumin induces apoptosis in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells through ER stress and caspase cascade- and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Res* 30(6):2125-2133.
- Younis M & Fathy GM (2013) Upregulation of extrinsic apoptotic pathway in curcumin-mediated antiproliferative effect on human pancreatic carcinogenesis. *J Cell Biochem* 114(12):2654-2665.
- Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I & Simon HU (2009) Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 16(11):1438-1444.
- Zhang X, Kluger Y, Nakayama Y, Poddar R, Whitney C, DeTora A, Weissman SM & Newburger PE (2004) Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *Journal of Leukocyte Biology* 75(2):358-372.
- Zhou H, Beevers CS & Huang S (2011) The targets of curcumin. *Curr Drug Targets* 12(3):332-347.
- Zhu J, Bultynck G, Luyten T, Parys JB, Creemers JW, Van de Ven WJ & Vermorken AJ (2013) Curcumin affects proprotein convertase activity: elucidation of the molecular and subcellular mechanism. *Biochim Biophys Acta* 8(35):10.
- Zingg JM, Hasan ST & Meydani M (2013) Molecular mechanisms of hypolipidemic effects of curcumin. *Biofactors* 39(1):101-121.

