

FACULTÉ DES SCIENCES

CENTRE DE L'OXYGÈNE RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT

PROFESSEUR D. SERTEYN

Université
de Liège



L'activité de la NADPH oxydase : une nouvelle cible pour la curcumine ?



DISSERTATION PRÉSENTÉE PAR

SANDRINE DEROCHETTE

EN VUE DE L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR EN

SCIENCES

ANNÉE ACADÉMIQUE

2014-2015

L'activité de la NADPH oxydase : une nouvelle cible pour la curcumine ?

La NADPH oxydase (Nox2) des neutrophiles (PMNs) est une enzyme multi-protéique impliquée dans la production d'espèces activées de l'oxygène (ROS) nécessaires pour la destruction des pathogènes. L'activation excessive des PMNs est souvent associée à des pathologies mortelles chez le cheval, faisant de l'activité de la Nox2 une cible thérapeutique privilégiée. Le premier but de ce travail, a été de développer une méthode appelée "cell-free system" (CFS) pour mesurer l'activité *in vitro* de la Nox2 équine. Un inconvénient de cette technique est l'interférence possible entre les inhibiteurs et la sonde utilisée pour la mesure de l'activité. Sur base de notre CFS, nous avons conçu et développé l'EquiNox2, un nouvel outil pharmacologique, pour étudier les interactions entre des inhibiteurs et la Nox2 et leurs effets sur l'assemblage et l'activité de l'enzyme. Cette méthode consiste en la mesure *in vitro* de l'activité de la Nox2 fixée sur un support solide, ce qui permet d'éliminer les inhibiteurs avant la mesure de l'activité enzymatique et de réduire les interférences observées en CFS. Le CFS et l'EquiNox2 ont été validés avec le diphénylène iodonium et le Gp91ds-tat, deux inhibiteurs connus de la Nox2 humaine. Le second but de ce travail était l'étude du NDS27, un complexe de lysinate de curcumine avec l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD) sur la réponse oxydante des PMNs. Le NDS27, n'est pas toxique et est capable d'entrer dans les PMNs, d'interagir leurs membranes et d'inhiber l'activité de la myéloperoxydase, de la Nox2 et de la PKC δ (un activateur de la Nox2) impliquées dans la production de ROS. Nous avons montré, par CFS et EquiNox2, que le NDS27 se fixe fortement à la Nox2 pour empêcher son assemblage et que l'HP β CD, l'excipient du NDS27, en plus de solubiliser et de transporter la curcumine, augmente l'action de celle-ci sur les activités de la PKC et la Nox2. L'effet modulateur du NDS27 sur l'activation de la Nox2 ouvre des perspectives thérapeutiques pour le traitement des pathologies accompagnées de réactions inflammatoires excessives.

Activity of NADPH oxidase: a new target for curcumin ?

The NADPH oxidase (Nox2), a multi-component enzyme found in neutrophils (PMNs), generates reactive oxygen species (ROS) to kill pathogens. In horses, excessive activation of PMNs is often associated with deadly pathologies making the modulation of Nox2 activity a prime therapeutic target in the management of inflammation. The first aim of this work was to develop a method called cell-free system (CFS) to measure the *in vitro* activity of equine Nox2 and to test the effects of potential inhibitors on the enzyme activity or assembly. A major drawback of this technique lies in the potential interferences between inhibitors and the probe used to measure the activity. Based on our CFS, we designed a new pharmacological tool, the EquiNox2, to determine the direct interaction of potential inhibitors with equine Nox2 and their effect on the enzyme activity or assembly. This method consists in the *in vitro* measurement of Nox2 activity bound onto a solid support which allows for the elimination of the inhibitors prior to the measurement of activity, thus avoiding the risk of the interferences observed for the CFS. The CFS and EquiNox2 were validated using diphenyleiodonium chloride and Gp91ds-tat, two inhibitors largely described for human Nox2. The second aim of this work was the study of NDS27, a complex of curcumin lysinate with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD), on oxidant response of PMNs. NDS27, without affecting cell viability, was able to cross and interact with cell membranes to inhibit the activity of three enzymes involved in ROS production: myeloperoxidase, Nox2 and PKC δ , a Nox2 activator. We demonstrated by both CFS and EquiNox2 methods that NDS27 could strongly bind to Nox2 and prevent its assembly. We also showed that the excipient of NDS27, HP β CD, not only solubilised and transported curcumin, but also indirectly enhanced its action on both PKC and Nox2 activities. The modulatory effect of NDS27 on the Nox2 activation pathway of neutrophils may open potential therapeutic solutions for the treatment of pathologies with excessive inflammatory reactions.

Mon doctorat en chiffre c'est 936 jours passés devant ma paillasse et mon ordinateur, 4 cahiers de laboratoires un dossier "F.R.I.A." de 1,44 Go contenant 452 dossiers et 2955 fichiers, 2 congrès internationaux, 3 articles publiés, 1 article en cours de publication et enfin une thèse de 189 pages.

Mais c'est surtout une formidable aventure riche en rencontres, en moments de joie et de doute, qui m'a permis de m'épanouir et de faire pendant quatre années ce que j'aime tout simplement.

Et faire ce que l'on aime, c'est encore mieux quand on est bien entouré...

Tout d'abord, par la formidable petite équipe des CORDiens...

Dirigée par "le chef", Didier Serteyn, qui m'a permis de réaliser cette belle aventure et m'a fait confiance pour mener à bien ce projet. Merci à vous pour votre aide, vos conseils tout au long de mon parcours et pour m'avoir aidé à trouver des titres toujours plus "sexy" !

Mais il y a aussi un autre "chef", sans qui le CORD ne serait plus ce qu'il est. Je parle du chef labo, chef manip, Titi, Smurfy, Coco et j'en passe... Je te remercie Thierry pour avoir, tout d'abord, concéder à me laisser un de tes deux bureaux et à m'avoir supportée pendant autant de temps. Ensuite, je te remercie pour avoir été là tout au long de ma thèse : tu m'as encadrée, remonté le moral dans les périodes où plus rien ne fonctionnait, tu as lu, relu et rere lu mes articles, rapports et projets, tu t'es cassé la tête pendant des heures à comprendre mes résultats (parfois un peu farfelus) pour toujours essayer d'en tirer le meilleur... Tout ça mérite bien plus qu'un merci et je cherche toujours un mot qui exprimerait toute ma gratitude... Je pense que ça sera plus simple de te payer une bière !

Le CORD serait aussi moins drôle sans les CORDiennes. Ari notre petite technicienne en chef, parfois un tantinet râleuse mais toujours prête à rendre service ! Tu es surtout une maman pour nous tous et tes "Pompoooooonnn caféééééé" vont me manquer ! Notre Juju nationale, toujours là pour donner de précieux conseils et nous éclairer sur des notions de marketing souvent très obscures pour les rats de labo que nous sommes ! Et notre très regrettée Jen... Alors, oui, je sais bien que tu es toujours bien en vie et que n'es pas si loin du CORD mais tes cris, ta bonne humeur et l'odeur de tes bons petits plats à midi nous manquent énormément !

Au fin fond du couloir, il y a aussi le repère de M. Ange... Je te remercie pour toute l'aide que tu as apportée dans ce travail : corrections, relectures, conseils et pour les manips en EPR parce que : "ça fait quand même bien dans un article" !

Il y a aussi les "anciens" du CORD qui ne sont jamais vraiment bien loin... Merci énormément à Madame Deby pour toutes les heures que vous avez passées à me lire et à me corriger et pour vos petits commentaires sur les règles d'orthographe : vous aurez remarqué que ce n'est pas toujours mon point fort ! Merci aussi à Laurette pour égayer nos mardis avec sa bonne humeur et ses petites histoires qui n'arrivent qu'à elle !

Mais il y a également toute une série de personnes qui m'ont aidée de près ou de loin à réaliser ce travail...

Merci au Prof. Jacques Piette d'avoir accepté d'être mon co-promoteur pour que je puisse réaliser ma thèse en faculté des Sciences.

Merci au Dr. Tania Bizouarn, au Prof. Pierre Van Antwerpen, au Prof. Moreno Galleni, au Prof. Fabrice Bureau et au Prof. Karim Zouaoui Boudjeltia d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci Philippe Neven de m'avoir laissé travailler avec ton "bébé", le NDS27, quand les premiers résultats de ma thèse prenaient du temps à arriver ! Finalement, il n'est pas si mal ce NDS27 !

Merci à toute l'équipe de Mont-le-Soie et de la clinique équine pour les nombreux prélèvements de sang que vous avez faits pour moi et merci à tous les généreux donateurs, ils n'ont pas vraiment eu le choix, mais sans eux ce travail n'aurait jamais pu être réalisé ! Un merci plus particulièrement à Sylvie et Catherine qui sont toujours de bons conseils lorsque l'on en a besoin !

Merci aux Bios, sans qui toutes ces années à l'Unif auraient été beaucoup moins drôles et festives ! Un merci plus particulier à mon pti chou, Magali Van Linden, pour être toi et pour m'avoir aidée à corriger mon anglais et raccourcir mes phrases un chouilla trop longues ! Merci à ma p'tite Steph pour nos escapades du temps de midi et pour tous les bons sandwiches que l'on a mangés et tous les ragots que l'on a pus se raconter chaque semaine ! Merci aussi au reste de l'équipe de choc : Cécile, Barbara et Céline pour nos cours d'abdos-

fessiers (un esprit sain dans un corps sain...) et nos sorties toujours sympa ! C'est quand le prochain city-trip ?

Merci à ma famille et mes parents qui m'ont permis de faire ces études et qui m'ont donné le goût du labo... Parce que la biochimie ce n'est pas si éloigné de la chimie finalement... Merci à ma maman pour la relecture de ma thèse !

Merci à mon petit Mojo, qui ne m'a pas vraiment aidée pour avancer dans ce travail, mais qui est toujours présent pour une petite sieste réparatrice !

Je garde le meilleur pour la fin, merci à mon Pilou, merci d'être à mes côtés depuis ces dix dernières années, merci de me supporter chaque jour (et je sais bien à quel point je peux être têtue et râleuse) et merci de t'être lancé avec moi dans cette fabuleuse aventure qu'est l'achat de notre maison. Vivement la suite...



Je suis le maître de mon destin

Je suis le capitaine de mon âme

Invictus, William Ernest Henley

Liste des abréviations

16-DSA	Acide 16-doxy-stéarique
¹O₂	Oxygène singulet
5-DSA	Acide 5-doxy-stéarique
AA	Acide arachidonique
Ac.Ac.	Acide acétique
AD	Domaine d'activation
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIR	Région auto-inhibitrice
Akt	Protéine kinase B
AP-1	"Activator protein 1"
Bem 1	"Bud emergence protein 1"
Cd	"Compound"/Composé
cdc	"Cell division cycle"
CFS	'Cell-free system"
CGD	"Chronic granulomatous disease" / Granulomatose septique chronique
CL	"Chemiluminescence"/Chimiluminescence
COX2	Cyclooxygénase
DAG	Diacylglycérol
DCF	Dichlorofluorescéine
DCFH(-DA)	Dichlorofluorescine (diacétate)

DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
DPI	Diphénylène iodonium
Duox	"Dual oxidase"
e⁻	Electron
E	Energie
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
Erk 1/2	"Extracellular regulated kinase 1/2"
ETOH	Ethanol
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADH2	Flavine adénine dinucléotide réduit
Fc	Fraction cristallisable
fMLP	N-formyl-méthionine-leucine-phenylalanine
FMN	Flavine mononucléotide
GDP	Guanosine diphosphate
GM-CSF	"Granulocyte macrophage colony stimulating factor"
GTP	Guanosine triphosphate
GTP-γ-S	Guanosine 5'-[γ-thio]triphosphate
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HBSS	"Hank's balanced salt solution"
HIV	"Human Immunodeficiency Virus" / Virus d'immunodéficience humaine
HOCl	Acide hypochloreux

HPβCD	Hydroxypropyl- β -cyclodextrine
HRP	"Horseradish peroxidase"/ Peroxydase de raifort
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
IMDM	"Iscove's modified Dulbecco's media"
INF	Interféron
LiDS	Lithium dodécyl sulfate
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leukotriène B4
MPO	Myéloperoxydase
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit
NET	"Neutrophil Extracelullar Trap"/ Piège extracellulaire du neutrophile
NF-κB	"Nuclear factor-kappa B"
NO$^{\circ}$	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
Nox2	NADPH oxydase phagocytaire
O$_2^{\circ-}$	Anion superoxyde
OH$^{\circ}$	Radical hydroxyle
ONOO$^-$	Peroxynitrite
OpZ	Zymosan opsonisé
PAF	"Platelet Activating Factor" / Facteur d'activation plaquettaire
PAK	"p21 activated kinase"

PB1	"Phox and Bem 1"
PBS	"Phosphate buffered saline"/Tampon phosphate salin
PC	"Phox and Cdc"
phox	"Phagocyte oxidase"/ Oxydase phagocytaire
PI2P	Phosphatidylinositol 2-phosphate
PI3,4P2	Phosphatidylinositol 3,4-diphosphate
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PI4P	Phosphatidylinositol 4-phosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
PPAR	"Peroxisome proliferator-activated receptor"
PRR	"Proline rich region"/Domaine riche en proline
PX	Domaine "phox homology"
RAO	"Recurrent airway obstruction"/Obstruction récurrente des voies respiratoires
Rho GDI	"Rho guanosine diphosphate dissociation inhibitor"
ROO[•]	Radical peroxy
ROS	"Reactive Oxygen Species" / Espèces activées de l'Oxygène

SDS	Sodium dodécyl sulfate
-SH	Thiol
SH3	"src Homolgy 3 domain"
SIEFED	"Specific Immuno-Extraction Followed by Enzymatic Detection""
SOD	Superoxyde dismutase
STAT3	"Signal transducer and activator of transcription 3"
tat	"Trans-Activator of Transcription"
TLR	"Toll-like receptor" / Récepteurs Toll
TNF-α	"Tumor Necrosis Factor alpha"
TPR	Répétitions tétratricopetide
γ-CD	γ -cyclodextrine

Table des matières

Introduction.....	23
Avant propos	23
Le polymorphonucléaire neutrophile (PMN).....	23
Généralités et structure	23
Migration et mécanismes de défense.....	24
L'Oxygène	27
Généralités	27
Rôle physiologique des ROS	27
Réactivité des ROS.....	28
Systèmes de protection contre les ROS	29
La NADPH oxydase phagocytaire	30
Généralités	30
Les sous-unités membranaires.....	31
Les sous-unités cytosoliques	33
La granulomatose septique chronique (CGD).....	37
Activité de la NADPH oxydase	38
Les autres Nox	45
Les autres enzymes de la flambée respiratoire	47
La myéloperoxydase.....	47
La NO synthase.....	52
Pathologies liées à une activation excessive des PMNs.....	54
Modulation de la NADPH oxydase	55
La curcumine et le NDS27	56
La curcumine	56

Le NDS27	59
Buts du travail.....	63
Présentation synoptique des résultats	65
Mise au point d'outils pour la mesure de l'activité de la NADPH oxydase des PMNs équins	65
Le « cell-free system » (voir Article II p.109).....	65
L' « EquiNox2» (voir Article IV p.147).....	70
Etude de l'activité du NDS27	77
Etude de l'activité du NDS27 sur la réponse oxydante des PMNs et des cellules HL-60 (voir Article I p.89).....	77
Etude de l'activité du NDS27 sur deux enzymes impliquées dans la production de ROS par les PMNs : la NADPH oxydase et la PKC (voir Article III p.125).....	80
Présentation systématique des résultats.....	89
Article I	89
Intra- and extracellular antioxidant capacities of the new water-soluble form of curcumin (NDS27) on stimulated neutrophils and HL-60 cells	89
Abstract	89
Introduction.....	90
Material and methods.....	92
Results	97
Discussion	104
Article II	109
Curcumin and resveratrol act by different ways on NADPH oxidase activity and reactive oxygen species produced by equine neutrophils.....	109
Abstract	109
Introduction.....	110
Material and methods.....	112

Results	115
Discussion	120
Article III	125
NDS27 combines the effect of curcumin lysinate and hydroxypropyl- β -cyclodextrin to inhibit equine PKC δ and NADPH oxidase involved in the oxidative burst of neutrophils .	125
Abstract	125
Introduction.....	126
Material and methods.....	127
Results	133
Discussion	141
Article IV	147
EquiNox2: a new method to measure NADPH oxidase activity and to study effect of inhibitors and their interactions with the enzyme	147
Abstract	147
Introduction.....	148
Material and methods.....	149
Results	154
Discussion	160
Discussion générale et perspectives	165
Le "cell-free system" et l'EquiNox2	165
Développement, optimisation et validation du "cell-free system"	165
Développement, optimisation et validation de l'EquiNox2	167
Conclusions.....	170
Effet de molécules d'origine naturelle sur l'activité de la NADPH oxydase.....	171
Conclusions.....	174
Perspectives.....	175

Références bibliographiques..... 177

Introduction

Avant propos

Chez le cheval comme chez l'homme, la réponse inflammatoire implique une réponse oxydante du neutrophile appelée flambée respiratoire. Elle est déclenchée par la NADPH oxydase, une enzyme clé qui permet de former l'anion superoxyde, la première espèce activée de l'oxygène ("Reactive Oxygen Species" ou ROS) d'où dérivent principalement les autres ROS. Les ROS sont formées via l'action de deux autres enzymes : la myéloperoxydase (MPO) et la NO synthase. Ces espèces produites sont nécessaires pour la dégradation des agents pathogènes, mais lors d'une inflammation excessive, qui accompagne de nombreuses pathologies chez le cheval ou chez l'homme, leur libération importante dans le milieu extracellulaire peut être responsable de dommages aux cellules voisines en causant des oxydations au niveau des lipides, protéines, hydrates de carbone et acides nucléiques. Il existe donc un réel intérêt de comprendre ce processus inflammatoire afin de l'anticiper mais aussi de le contrôler de manière thérapeutique en modulant notamment les enzymes qui le régissent [1-4].

Le polymorphonucléaire neutrophile (PMN)

Généralités et structure

Les polymorphonucléaires neutrophiles (ou plus simplement neutrophiles) doivent leur nom à la forme plurilobée de leur noyau. Ce sont les cellules les plus représentées de la lignée blanche et qui constituent entre 40 et 75 % des cellules du sang circulant.

Ils représentent une ligne de défense indispensable contre les maladies bactériennes et fongiques et possèdent de nombreuses granulations cytoplasmiques contenant différents puissants agents antimicrobiens. Ces granulations sont de quatre types : les granulations primaires ou azurophiles, secondaires ou spécifiques, tertiaires ou à gélatinase et les vésicules sécrétoires [5-9].

Les granulations primaires ou azurophiles contiennent plusieurs enzymes comme la cathepsine G, la myéloperoxydase, la NO synthase ou l'élastase ainsi que les défensines et du lysozyme. La cathepsine G et l'élastase sont deux enzymes à sérine active qui catalysent

respectivement l'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau d'acides aminés volumineux et d'acides aminés neutres. Les défensines sont des peptides cationiques riches en cystéines qui s'intercalent dans les membranes des microorganismes et y créent des pores. Le lysozyme est une hydrolase acide qui clive les glycosaminoglycanes de la paroi bactérienne.

Les granulations secondaires ou spécifiques sont plus nombreuses et plus petites que les granulations primaires, sont riches en substances antimicrobiennes et contiennent les sous-unités membranaires de la NADPH oxydase, du lysozyme, de la trans-cobalamine 1 et des protéines membranaires. La trans-cobalamine 1 est un transporteur de la vitamine B12 ayant un rôle important dans la synthèse des acides nucléiques.

Les granulations tertiaires ou à gélatinase contiennent principalement des enzymes permettant de dégrader le collagène et la matrice extracellulaire comme la gélatinase.

Les granulations sécrétoires permettent le stockage des récepteurs membranaires intervenant dans la migration des PMNs vers le site de l'inflammation.

Migration et mécanismes de défense

Les neutrophiles se trouvent à l'état latent dans la circulation sanguine, où leur durée de vie est de 6 à 12h. Lors d'une infection ou d'une inflammation, des médiateurs pro-inflammatoires ("Tumor necrosis factor alpha" ou TNF α , lipopolysaccharide ou LPS,...) induisent un état de pré-activation ou "priming" des neutrophiles. Ces facteurs favorisent un changement de l'endothélium vasculaire et permettent la fusion des granules sécrétoires avec la membrane du neutrophile, avec pour résultat l'expression de protéines d'adhérence à sa surface. Les PMNs seront alors capables de traverser l'endothélium par diapédèse pour arriver dans les tissus infectés où leur durée de vie augmente (2 à 3 jours) [10, 11]. La migration des neutrophiles à travers les tissus se fait en suivant un gradient de facteurs chimiotactiques comme le dérivé C5a du complément, les formyl-peptides produits par les bactéries dégradées comme le N-formyl-méthionine-leucine-phénylalanine (fMLP), l'interleukine 8 (IL-8), le facteur d'activation plaquettaire (PAF) ou le leukotriène B4 (LTB4). L'exposition des neutrophiles à ce second stimulus induit leur activation (Figure 1). Une fois arrivés au site infecté, ils reconnaissent le pathogène via des motifs de surface, spécifiques, conservés au cours de l'évolution et retrouvés chez une grande variété de microbes. Ces motifs sont reconnus par des récepteurs comme les récepteurs de type Toll ("Toll-like

Receptor" ou TLR); les récepteurs Fc γ (récepteur à tyrosine kinase), reconnaissant les particules recouvertes d'immunoglobulines G (IgG); et les récepteurs des protéines du complément [10, 12]. Ces agents infectieux sont ensuite phagocytés, c'est-à-dire inclus dans une vacuole formée par la membrane du neutrophile, appelée phagosome. La dégradation du pathogène phagocyté se fait via des mécanismes dépendants et indépendants de l'oxygène. La fusion des granules avec le phagosome pour former le phagolysosome permet la libération des protéases, des peptides antibactériens et des ROS dans la vacuole menant à la dégradation des microorganismes. Cette production de ROS par les neutrophiles, appelée flambée respiratoire, fait intervenir la NADPH oxydase, la myéloperoxydase et la NO synthase, trois enzymes présentes dans leurs granules. Les PMNs peuvent également libérer le contenu de leurs granules à l'extérieur de la cellule. Ce phénomène a lieu lorsque les récepteurs présents à leur surface se lient à des substances provenant de tissus endommagés, de processus inflammatoires ou de bactéries [13].

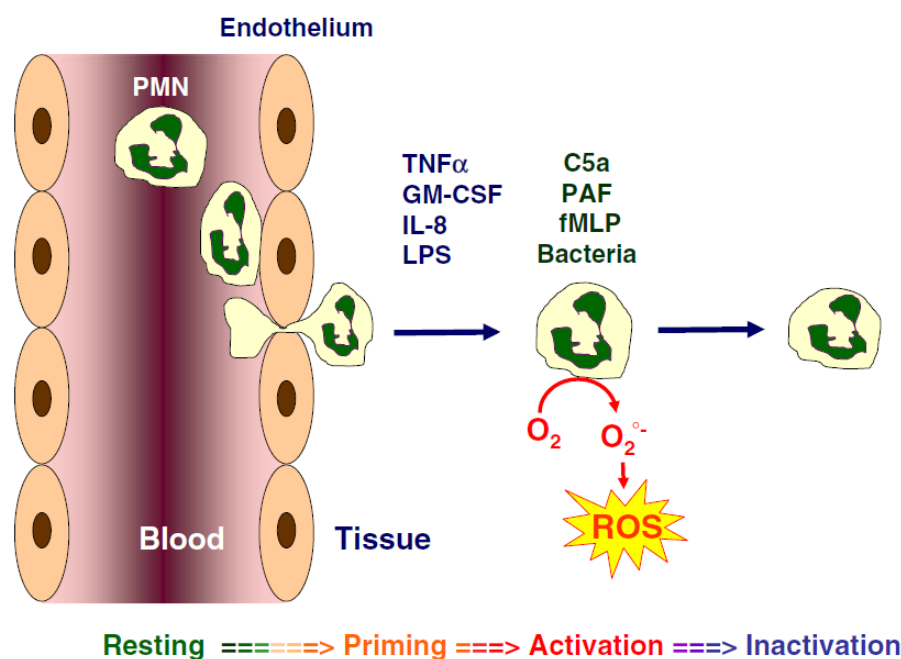


Figure 1. Représentation schématique des états d'activation du neutrophile. Les neutrophiles circulants se trouvent dans un état dormant ("resting state"). Lors d'une infection ou inflammation, des médiateurs pro-inflammatoires (TNF α , IL-8, GM-CSF,...), induisent un changement de l'endothélium vasculaire qui permet aux neutrophiles de le traverser par diapédèse. Au niveau du site inflammatoire, les neutrophiles pré-activés ("priming state") sont activés par le pathogène ou par d'autres agents (C5a, PAF,...). L'activation des neutrophiles induit la libération de ses peptides antibactériens, protéases et ROS qui contribuent à la destruction de l'élément pathogène. L'inactivation des neutrophiles permet de limiter le site de l'inflammation [14].

En plus de leur activité de phagocytose, les neutrophiles ont la capacité de former des pièges extracellulaires ("Neutrophil Extracellular Traps" ou NET), une sorte de filet en trois dimensions formé du contenu nucléaire des neutrophiles (Figure 2). Ils piègent les pathogènes, empêchent leur dispersion et les détruisent en les exposant aux agents antimicrobiens contenus dans leurs granules mais aussi grâce à l'action des histones qui sont de puissants agents antimicrobiens [15]. Les NETs sont formés par la fragmentation de l'enveloppe nucléaire, la décondensation de la chromatine et la libération des enzymes granulaires qui vont adhérer à la chromatine décondensée. La rupture de la membrane plasmique permet la libération des NETs. L'oxygène singulet (voir chap. L'Oxygène p.27) et plus généralement les ROS jouent un rôle central dans la cascade de signalisation permettant la formation des NETs. Les neutrophiles de personnes déficientes en NADPH oxydase et en myéloperoxydase sont d'ailleurs incapables d'en former. L'évolution a cependant permis à certains microorganismes de se défendre contre ce mécanisme via la production de désoxyribonucléase (DNase), comme c'est le cas pour certains streptocoques [10, 15, 16].

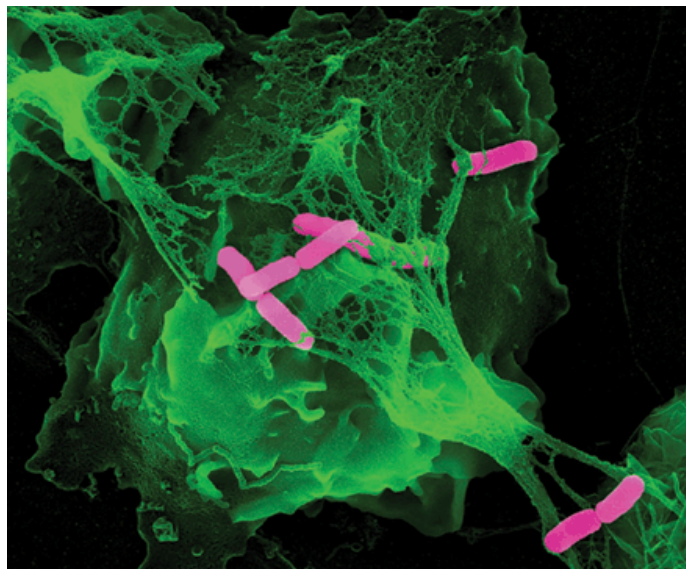


Figure 2. Les pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) représentent un mécanisme de défense par lequel ces cellules capturent et détruisent les pathogènes [17].

L'Oxygène

Généralités

L'oxygène est une source abondante d'énergie qui intervient dans de nombreuses réactions biochimiques mais c'est aussi un puissant agent oxydant qui peut causer des dommages cellulaires (protéines, acide désoxyribonucléique ou ADN, lipides,...). L'oxygène moléculaire est inerte car il se trouve à l'état triplet (il possède deux électrons célibataires sur sa couche de valence) et, selon la règle de restriction des spins, il ne peut pas réagir avec la plupart des molécules organiques qui se trouvent à l'état singulet. Sa réactivité augmente lorsqu'il est transformé en espèces activées de l'oxygène [18]. Les ROS peuvent être radicalaires comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) ou non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (1O_2). Elles sont formées à partir de l'oxygène soit par un transfert d'énergie ou par un transfert d'électrons (Figure 3). La production de ROS dans l'organisme est généralement un produit secondaire ou intermédiaire de l'activité de certaines enzymes (peroxysome, cytochrome p450, enzymes mitochondriales,...), mais il existe des enzymes dont la fonction principale est la production de ces espèces : la myéloperoxydase, la NO synthase et la NADPH oxydase. Parmi ces enzymes, la NADPH oxydase phagocytaire a été la première à être identifiée [19].

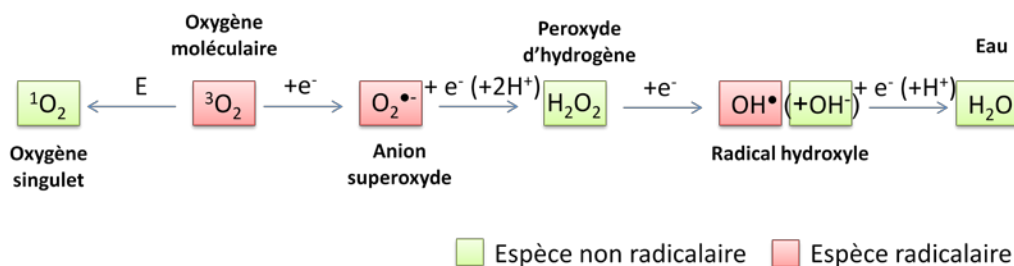


Figure 3. Génération de différentes ROS à partir d'oxygène moléculaire suite à un transfert d'énergie ou un transfert successif d'électrons. E : énergie; e^- : électron. Adapté de Apel et al. (2004) [20].

Rôle physiologique des ROS

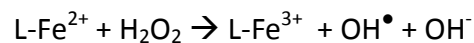
Les ROS ont un rôle important dans la défense immunitaire innée mais aussi en tant que messager dans différentes voies de signalisation cellulaire (croissance, survie, apoptose, sénescence, prolifération et différenciation des cellules). Dans la défense immunitaire, les ROS peuvent avoir un rôle microbicide direct en oxydant les protéines, l'ADN et les lipides des microorganismes. Cette activité est aujourd'hui assez controversée car des souris

déficientes en protéases mais capables de produire des ROS présentent le même type d'infections récurrentes que les personnes déficientes en NADPH oxydase [21]. Il existe un concept alternatif : la production de ROS ne serait pas cruciale pour la destruction des microorganismes, mais c'est le changement de pH et la concentration en ions qui découlent de l'activité de la NADPH oxydase qui importerait. En effet, l'activation de la NADPH oxydase produit des $O_2^{\bullet-}$ qui consomment les protons du phagosome pour former du H_2O_2 et entraînent l'alcalinisation du pH qui favorise l'activation des protéases. Le transport des électrons à travers la membrane nécessite un équilibrage des charges via des canaux à H^+ mais aussi des canaux à K^+ (voir chap. Transfert des électrons p.41) qui peuvent contribuer à la destruction des pathogènes via un changement de concentration ionique et de pH permettant la libération des protéases telles que l'élastase et la cathepsine G [11, 19, 21].

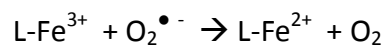
Réactivité des ROS

La première espèce formée lors de la flambée respiratoire est l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Il est peu réactif et chargé, ce qui l'empêche de traverser la membrane, même si certains auteurs rapportent l'exocytose de l' $O_2^{\bullet-}$ [22]. Il exerce son activité principalement dans le phagosome. Sa réactivité pourrait être augmentée dans des milieux non polaires et à pH faible par la formation d'un dérivé protoné HO_2^{\bullet} qui peut jouer un rôle direct dans la destruction des microorganismes [19]. De plus, l' $O_2^{\bullet-}$ est rapidement transformé en H_2O_2 , spontanément, ou catalysé par la superoxyde dismutase (SOD). L' H_2O_2 est relativement stable, il peut diffuser à travers la membrane et possède un pouvoir bactéricide. Il peut aussi être utilisé par des peroxydases comme la myéloperoxydase pour former des espèces oxydantes puissantes (ex. l'acide hypochloreux, HOCl) capables de détruire des bactéries et d'inactiver leurs facteurs de virulence. Mais ce n'est pas le seul mécanisme de défense car la plupart des personnes déficientes en myéloperoxydase ne présentent pas de signe d'infection récurrente. L' $O_2^{\bullet-}$ peut rapidement réagir avec le NO^{\bullet} , formé par la NO synthase, pour produire le peroxynitrite ($ONOO^-$), puissant oxydant capable de fragmenter l'ADN et d'oxyder les lipides et les protéines. L'agent oxydant le plus puissant identifié à ce jour est le radical hydroxyle formé lors de la réaction de Fenton en présence obligatoire de métaux de transition (Fe^{2+}) complexés par un ligand activateur (Équation 1). Le Fe^{3+} complexé pourrait être ramené ensuite au stade Fe^{2+} par l'anion superoxyde (Équation 2), l'ensemble des deux réactions constituant le bilan ou le cycle d'Haber-Weiss. Mais la production du OH^{\bullet} *in vivo*

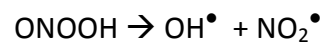
par la réaction de Fenton est largement contestée car le fer se trouve généralement complexé à des protéines qui l'empêchent de participer aux réactions d'oxydoréduction [19, 23, 24]. Par contre, *in vivo*, le radical OH^\bullet peut provenir de la décomposition du peroxy-nitrite instable (Équation 3). Le OH^\bullet a une très courte durée de vie et réagit près de son site de production. L^1O_2 et le OH^\bullet sont des produits mineurs de la flambée respiratoire. Ils sont produits via l'activité de la myéloperoxydase, lorsqu'il y a réaction entre H_2O_2 et HOCl , et sont responsables de la peroxydation lipidique [18, 19, 23, 25].



Équation 1. Réaction de Fenton. L : ligand activateur [24].



Équation 2. Régénération du Fe^{2+} . L : ligand activateur [24].



Équation 3. Décomposition du peroxy-nitrite pour former le radical hydroxyle [26].

Systemes de protection contre les ROS

Malgré le rôle important des ROS dans la défense immunitaire, elles peuvent avoir un effet néfaste lorsque leur production devient incontrôlée et que ces espèces sont libérées en concentration excessive dans le milieu extracellulaire. Les ROS sont alors responsables de dommages cellulaires et tissulaires entraînant une réponse inflammatoire aiguë ou chronique qui accompagne de nombreuses pathologies chez le cheval et l'homme [1, 27]. Il existe donc des systèmes de protection, enzymatiques ou non, permettant de limiter la concentration en ROS et leur effets.

Parmi les systèmes de protection enzymatiques, citons la SOD, la catalase et la glutathion peroxydase. Il existe plusieurs types de SOD : la SOD cytosolique et extracellulaire avec du cuivre ou du zinc au centre actif et la SOD mitochondriale avec un centre actif comprenant du manganèse. Les SOD catalysent la dismutation de $\text{O}_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 , la catalase permet la réduction de H_2O_2 en H_2O et la glutathion peroxydase catalyse la réduction de H_2O_2 couplée à l'oxydation du glutathion réduit [28].

Il y a également des molécules anti-oxydantes qui protègent l'organisme en réagissant directement, molécule à molécule, avec les ROS produites. C'est ce qu'on appelle un effet

stoechiométrique ou "scavenger". Ces molécules stabilisent les espèces radicalaires en les réduisant et en se transformant elles-mêmes en radical plus stable, en général grâce à leur structure comprenant des doubles liaisons conjuguées qui permettent une délocalisation électronique. Les molécules anti-oxydantes peuvent également avoir un effet anti-catalytique, c'est-à-dire interférer avec les enzymes productrices de ROS ou avec la cascade de signalisation impliquée dans leur production [29]. Certaines de ces molécules sont produites par l'organisme, c'est le cas de l'acide urique ou du glutathion réduit, mais la plupart des antioxydants sont amenés par l'alimentation. Ce sont des molécules comme l' α -tocophérol (vitamine E), le β -carotène, l'acide ascorbique (vitamine C), la quercétine, la curcumine,... [25, 30, 31] Ces molécules agissent généralement en tant que "scavenger", mais elles sont de plus en plus étudiées pour leurs capacités anti-catalytiques.

La NADPH oxydase phagocytaire

Généralités

La production d'espèces oxydantes par les neutrophiles résulte de l'activation d'une enzyme multi-protéique, la NADPH oxydase (NADPH pour Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit), qui catalyse la formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). La NADPH oxydase a tout d'abord été étudiée et caractérisée dans les neutrophiles et les autres cellules phagocytaires, mais des enzymes similaires ont été découvertes dans d'autres types cellulaires, d'origine leucocytaire ou non, formant la famille des NADPH oxydase ou des Nox [11]. Le rôle important de la NADPH oxydase phagocytaire ou Nox2¹ dans la défense immunitaire innée est démontré chez les personnes souffrant de granulomatose septique chronique ("Chronic granulomatous disease" ou CGD). Ces personnes sont prédisposées à des infections bactériennes et fongiques récurrentes car leurs neutrophiles sont incapables de détruire les éléments pathogènes phagocytés (voir chap. La granulomatose septique chronique (CGD) p37).

L'enzyme est constituée de deux protéines membranaires, Gp91phox et p22phox (phox pour phagocyte oxydase), formant le flavocytochrome b_{558} et de sous-unités cytosoliques (p40phox, p47phox, p67phox et Rac). Au repos, les sous-unités sont distribuées entre la

¹ Correspond à la NADPH oxydase phagocytaire mais aussi à sa sous-unité membranaire Gp91phox.

membrane et le cytosol (Figure 4A). La stimulation des neutrophiles, induit la translocation des sous-unités cytosoliques vers le complexe membranaire pour former l'enzyme active et permettre le transfert des électrons du NADPH (provenant du "shunt" des hexoses mono-phosphate) vers l'accepteur final O_2 pour former l' $O_2^{\bullet-}$. Cette translocation implique un rôle important du cytosquelette et nécessite un changement de conformation de certaines sous-unités et la formation de liaisons inter-protéiques et protéines-lipides (Figure 4B) [18, 32].

Les sous-unités membranaires

Flavocytochrome b₅₅₈

La partie membranaire de l'enzyme est le (flavo)cytochrome b, aussi appelé (flavo)cytochrome b_{558/559} correspondant à son maximum d'absorption situé entre 558-559 nm ou, plus rarement, cytochrome b₂₄₅ dû à son potentiel de réduction moyen à -245 mV. C'est un hétérodimère constitué d'une glycoprotéine de masse moléculaire apparente comprise entre 70 et 90 kDa (Gp91phox ou Nox2) et d'une protéine non glycosylée de 22 kDa (p22phox). La sous-unité Gp91phox, dont le gène *CYBB* est présent sur le chromosome X, est le cœur catalytique de l'enzyme. Elle comprend six hélices transmembranaires, un domaine de fixation au NADPH et au FAD (Flavine adénine dinucléotide) dans sa partie C-terminale et quatre histidines conservées impliquées dans la fixation de deux hèmes situés entre les hélices III et V (Figure 5). Les hèmes ne sont pas identiques et présentent des potentiels d'oxydoréduction de -225 et -265 mV [22]. La Gp91phox est instable en l'absence de la protéine membranaire p22phox. Les personnes déficientes en p22phox n'ont d'ailleurs pas de Gp91phox détectable [19]. La p22phox est une protéine formée de deux domaines transmembranaires associée à la Gp91phox dans un rapport 1 : 1. Elle n'est stable que sous forme d'hétérodimère (Gp91phox-p22phox), les monomères étant dégradés par le protéasome. En plus de son rôle important dans la stabilisation de la Gp91phox, elle permet la fixation des protéines organisatrices cytosoliques grâce à un domaine riche en proline dans sa région C-terminale capable d'interagir avec les domaines SH3 de p47phox (Figure 4) [11, 19].

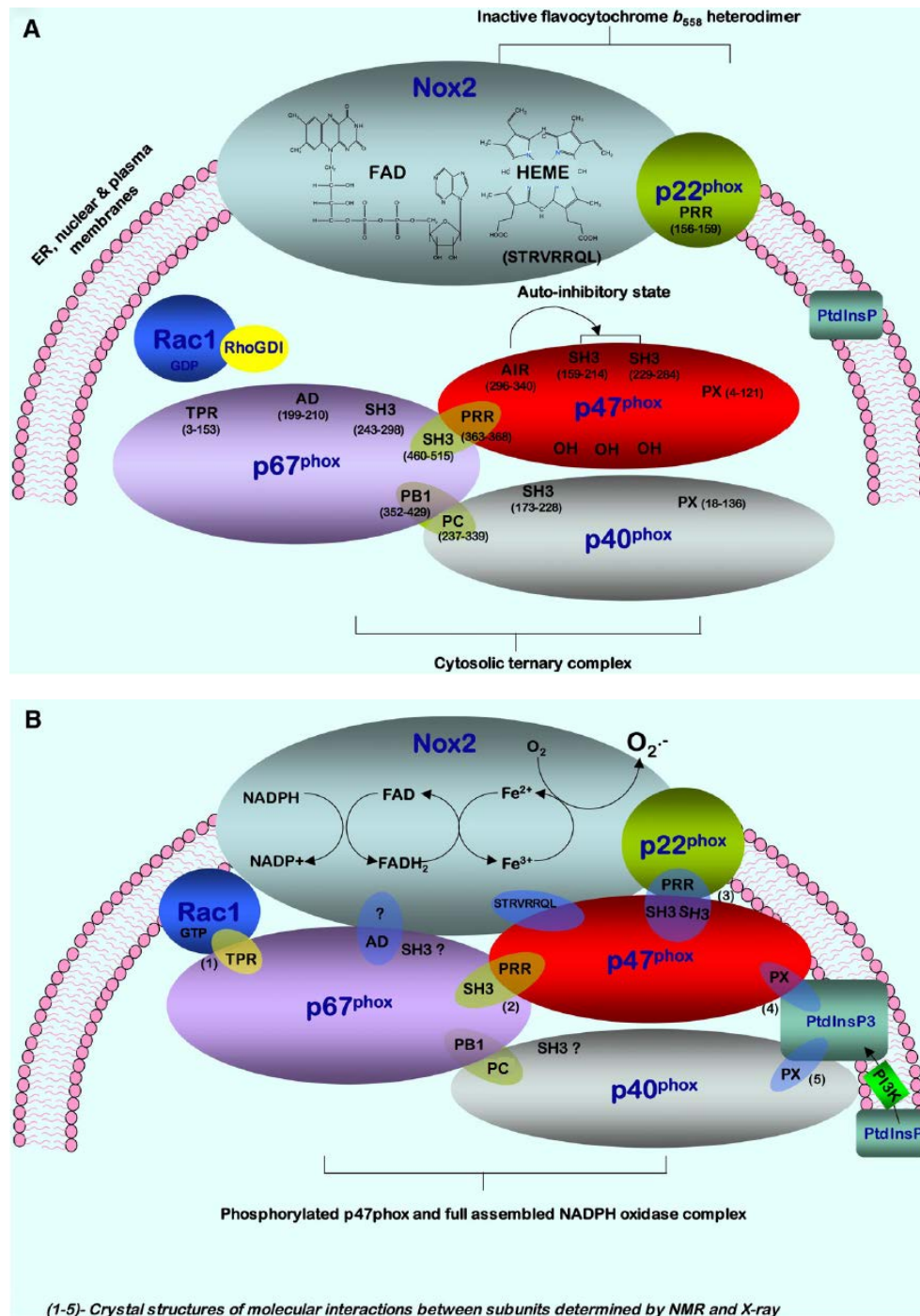


Figure 4. Représentation schématique des sous-unités cytosoliques et membranaires de la NADPH oxydase phagocytaire et des principales interactions moléculaires du complexe lorsqu'il est inactif (A) et lorsqu'il est activé (B). PRR : domaine riche en proline; SH3 : "src Homolgy 3 domain"; AIR : région auto-inhibitrice; TPR: répétitions tétratricopeptide; AD: domaine d'activation; PX: domaine "phox homology"; PtdInsP3 : Phosphatidylinositol triphosphate; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase; GTP: guanosine triphosphate; GDP: guanosine diphosphate. Adapté de Selemidis et *al.* (2008). [18]

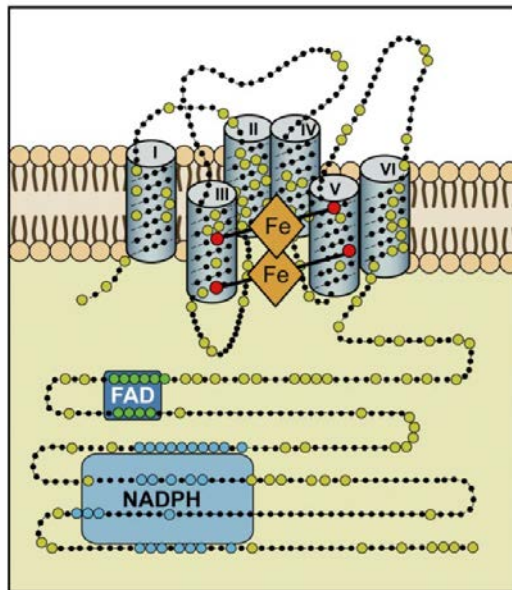


Figure 5. Suggestion de structure de la partie catalytique de la NADPH oxydase. Tous les membres de la famille des Nox présentent six hélices transmembranaires. Les domaines III et V comprennent chacun deux histidines impliquées dans la liaison de deux hèmes. La partie C-terminale contient des domaines de fixation au FAD et au NADPH [19].

Rap1a

Rap1A (aussi appelée Krev1) est une protéine G de 22 kDa faisant partie de la famille des protéines Ras et retrouvée abondamment dans les PMNs. C'est la première GTPase associée avec le flavocytochrome b_{558} de la NADPH oxydase phagocytaire (stœchiométrie 1 : 1) à avoir été identifiée [19]. Elle se lierait avec l'extrémité C-terminale du flavocytochrome b_{558} . Cette interaction est inhibée par la phosphorylation de Rap1A par la protéine kinase A (PKA) et Rap1a est activée via des médiateurs comme la phospholipase C (PLC). Son rôle dans la régulation de la NADPH oxydase est controversé selon les recherches montrant que sa déplétion induirait ou non une diminution l'activité de l'enzyme [33]. Elle pourrait également être impliquée dans l'activation avec la protéine kinase C (PKC) (voir chap. Activité de la NADPH oxydase p.38) [22].

Les sous-unités cytosoliques

p47 phox

La protéine basique p47phox (44,7 kDa) comprend de nombreux sites potentiels de phosphorylation, deux domaines "src Homology 3" (SH3) en tandem qui se lient à la partie C-terminale de la p22phox, un domaine riche en proline (PRR) permettant la liaison aux domaines SH3 de p67phox, une région auto-inhibitrice ("auto-inhibitory region" ou AIR) qui

empêche l'interaction de p47phox avec la membrane avant sa phosphorylation et un domaine "phox homology" (PX) qui joue un rôle dans la liaison aux phosphoinositides membranaires (Figure 6 et Figure 4). Le domaine PX comprend deux sites basiques qui se lient spécifiquement au phosphatidylinositol 3,4-diphosphate (PI3,4P2) et au phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P), respectivement. Il est possible que des enzymes comme la phosphatidylinositol 3-kinase et la phospholipase D régulent l'activation de la NADPH oxydase en modifiant la membrane pour créer une plateforme adéquate pour la translocation des sous-unités cytosoliques. On suggère également que le domaine PRR de p47phox se lierait au domaine SH3 de p40phox (et non p67phox) lorsque les neutrophiles ne sont pas activés et que la stimulation des PMNs libèrerait la p40phox, permettant au domaine PRR de s'associer avec le domaine SH3 de p67phox (Figure 4) [34, 35].

La protéine p47phox joue un rôle important en tant qu'organisateur. Dans les neutrophiles non stimulés, cette protéine se trouve sous forme libre ou sous forme de trimère avec les protéines p40phox et p67phox (stœchiométrie 1 : 1 : 1). La p47phox inactive forme deux liaisons intramoléculaires entre la région PXXP du domaine PX et son domaine SH3 situé en C-terminal ainsi qu'entre la région auto-inhibitrice et le deuxième domaine SH3 (Figure 6) [18]. Cette liaison intramoléculaire masque les domaines PX et SH3 et empêche ainsi l'interaction de p47phox avec les phosphoinositides membranaires et p22phox. Lors de l'activation des neutrophiles, la protéine p47phox est phosphorylée au niveau de sérines dans sa région polybasique, induisant une rupture de la liaison intramoléculaire et un changement conformationnel de la protéine, permettant l'activation de la NADPH oxydase. La protéine kinase C joue un rôle majeur dans la phosphorylation de p47phox mais d'autres kinases sont impliquées dans ce processus (PAK, Erk 1/2, p38, Akt,...). Suite au changement de conformation de p47phox, le trimère entier ou p47phox seule migre vers la membrane. C'est la première sous-unité à interagir avec le flavocytochrome b_{558} pendant l'activation des neutrophiles et sa fixation au cytochrome est nécessaire pour la translocation de p40phox et p67phox. Elle aurait également un rôle régulateur et faciliterait le transfert des électrons du FAD vers l'hème mais cela reste controversé [11, 19, 34]. La phosphorylation de certains résidus spécifiques de p47phox aurait également un rôle dans la désactivation de la NADPH oxydase [32].

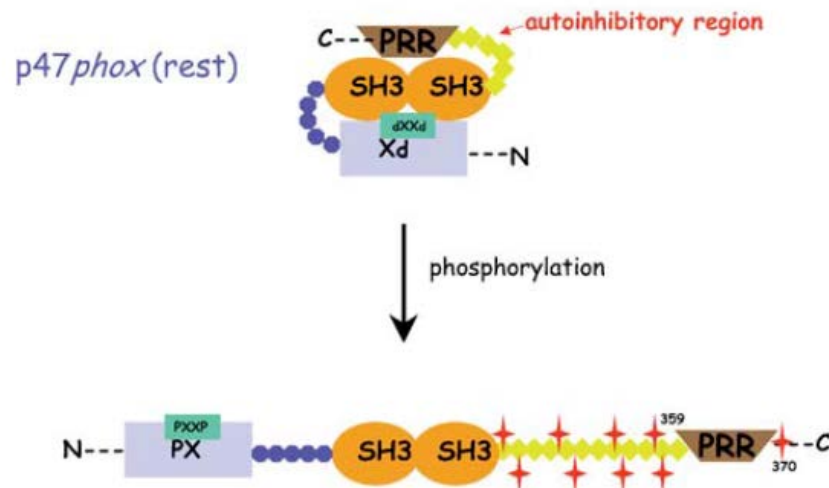


Figure 6. Modèle protéique de p47phox dans ses configurations activée et non activée. Les étoiles représentent les phosphorylations au niveau de la région AIR. PX : "phox homology" ; SH3 : "src homology 3 domain" ; PRR : "proline rich region" ; PXXP : domaine interne de la région PX interagissant avec les régions SH3 de p47phox [34].

p67phox

La protéine p67phox est une sous-unité de 59,8 kDa. Son association au flavocytochrome b_{558} est essentielle à l'activité de la NADPH oxydase. Elle comprend deux domaines SH3, un domaine PB1, un domaine riche en proline (PRR), un domaine d'activation (AD) et quatre répétitions tétratricopeptides (TPR) (Figure 7). Les répétitions TPR sont constituées d'une séquence de 34 acides aminés répétée entre 4 à 16 fois, présente dans une large variété de protéines (depuis la bactérie jusqu'à l'homme), intervenant dans les interactions protéines-protéines et dans l'assemblage des sous-unités d'enzymes multi-protéiques [34]. Les quatre domaines TPR sont impliqués dans la liaison à Rac avec une stœchiométrie 1 : 1 (Figure 4). Ces domaines constitueraient également un site de fixation au NADPH : il y aurait un site de faible affinité sur la Gp91phox et un site de plus haute affinité sur la p67phox [36]. Le domaine PB1 se lie par liaison électrostatique au domaine PC de p40 phox (Figure 4) et le domaine d'activation est un élément critique pour la régulation du transfert d'électrons et plus précisément pour le transfert du NADPH vers le FAD [33, 34].

Lors de la stimulation des neutrophiles, la translocation de p67phox au niveau de la membrane et la liaison entre le domaine d'activation et la Gp91phox provoque un changement de conformation du flavocytochrome b_{558} , induisant un flux d'électrons à travers le complexe [18]. Cette translocation se fait de façon continue c'est-à-dire avec un

échange permanent de p67^{phox} et Rac2 avec leurs homologues situés dans le cytoplasme, ce qui maintient la flambée respiratoire [19]. La protéine p67^{phox} est également un facteur limitant car elle est deux à trois fois moins concentrée par rapport à p47^{phox} [36]. La phosphorylation de p67^{phox} a lieu *in vivo* et *in vitro* (voie dépendante ou non de la PKC) mais l'implication de cette phosphorylation au niveau de l'assemblage ou de l'activité de l'enzyme reste inconnu [19, 34].

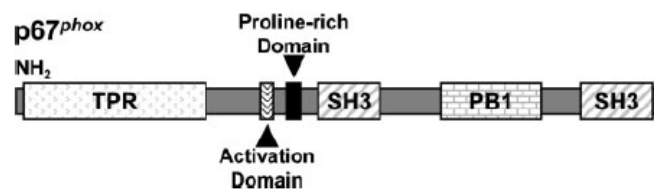


Figure 7. Modèle protéique de p67^{phox}. TPR : répétitions tétratricopeptide ; SH3 : "src homology domain 3" ; PB1 : "Phox and Bem 1" [11].

p40phox

Le gène de p40^{phox} code pour une protéine non glycosylée de 40 kDa qui est phosphorylée durant l'activation de l'enzyme. Elle comprend un domaine SH3, un domaine PX et un domaine PC ("Phox and Cdc") (Figure 8). Le domaine PC est un nouveau domaine d'interaction protéique identifié chez p40^{phox} et Cdc24p (facteur d'échange de nucléotides guanyliques chez la levure). La protéine p40^{phox}, stable uniquement lorsqu'elle est liée à p67^{phox} via son domaine PC (Figure 4), joue elle-même un rôle stabilisateur sur le trimère formé par les protéines cytosoliques et intervient dans la régulation de l'activité de Nox2. La translocation de p40^{phox} vers la membrane est fortement liée à son domaine PX qui est capable de se lier au phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), un lipide abondant dans la membrane du phagosome. Lorsque l'enzyme est inactive, une liaison intramoléculaire empêche le domaine PX d'interagir avec la membrane (Figure 8). La région SH3 de p40^{phox} permettrait également la liaison à la protéine membranaire p22^{phox}. Cependant, une déficience en cette protéine n'est pas à l'origine de granulomatose septique chronique et elle n'est pas non plus nécessaire en "cell-free system" (voir chap. Mesure de l'activité de la NADPH oxydase en "Cell-free system" p43) [19, 34, 35].



Figure 8. Modèle protéique de p40phox. PX : "phox homology" ; SH3 : "src homology domain 3" ; PC : "Phox and Cdc 1". Adapté de Sumimoto et al. (2005) [37].

Rac

La protéine Rac est une petite protéine G de la famille Rho qui comprend deux régions importantes appelées switch I et switch II et dont la configuration varie selon le nucléotide lié à Rac [7, 18]. Chez les mammifères, il existe trois homologues de Rac que l'on retrouve dans différents types cellulaires. Rac 1 est exprimée par tous les types cellulaires, Rac 2 est principalement exprimée dans les cellules myéloïdes dont les neutrophiles et Rac 3 dans le système nerveux central. Rac n'est pas une sous-unité de la NADPH oxydase à proprement parler car elle régule d'autres fonctions cellulaires et principalement au niveau du cytosquelette.

Dans les neutrophiles au repos, Rac est liée à un inhibiteur : le Rho "guanosine diphosphate dissociation inhibitor" (RhoGDI) via sa région switch II. Lors de l'activation, Rac se dissocie de RhoGDI, ce qui lui permet de se fixer à une molécule de GTP et de transloquer vers la membrane indépendamment des autres sous-unités cytosoliques (Figure 4) [19]. L'ancrage de Rac au niveau de la membrane se fait grâce à sa prénylation (ajout d'un groupement géranyl-géranyl) en C-terminal. La translocation de Rac au niveau de la membrane, se faisant moins bien chez les personnes déficientes en flavocytochrome b_{558} , suggère qu'il existe également une interaction directe entre Rac et le cytochrome. Elle interagit également avec les domaines TPR de p67phox (Figure 4). Rac a des fonctions similaires à p47phox, elle joue un rôle d'adaptateur permettant les interactions entre la partie catalytique de l'enzyme et l'élément régulateur p67phox. Suite à sa liaison avec Rac, il y a une modification de la conformation du domaine d'activation de p67phox, ce qui le rend fonctionnel [18, 34].

La granulomatose septique chronique (CGD)

La granulomatose septique chronique est un syndrome d'immunodéficience grave causant une diminution de la capacité bactéricide des PMNs sans affecter leur fonction de chimiotactisme, phagocytose et dégranulation. Elle est due à une mutation dans un des gènes codant pour cinq des sous-unités de la NADPH oxydase phagocytaire (Gp91phox,

p22phox, p47phox, p67phox ou Rac2), provoquant une diminution voire la suppression de l'activité de l'enzyme. Plus de deux tiers des cas sont dus à une mutation récessive au niveau du chromosome X affectant le gène *CYBB* qui code pour la Gp91phox. Le reste des cas est dû à des mutations récessives autosomales et, jusqu'à présent, il n'y a eu aucun cas de CGD dû à une mutation au niveau du gène codant pour p40phox [34, 38].

Cette pathologie se caractérise par des infections bactériennes et fongiques récurrentes sévères au niveau des tissus superficiels (peau et ganglions) et profonds (poumons, foie, intestins, os). Cette maladie doit son nom à la formation de granulomes inflammatoires formés par une accumulation de PMNs incapables de dégrader les microorganismes phagocytés. La signalisation cellulaire ROS-dépendante au niveau des neutrophiles et l'activation de l'apoptose des cellules inflammatoires (ex. via l'inactivation des médiateurs inflammatoires par les ROS) sont également inhibées et la réponse inflammatoire est prolongée [19]. Cependant, malgré l'absence d'activité de la NADPH oxydase, certains pathogènes peuvent être détruits par l'activité de la myéloperoxydase qui utilise comme substrat l' H_2O_2 produit par ces microorganismes [7, 11, 39].

Activité de la NADPH oxydase

Activation de la NADPH oxydase

L'activation de la Nox2 peut se faire via différentes voies de signalisation par l'intermédiaire de récepteurs tyrosine kinase (ex. récepteurs Fc), de récepteurs aux facteurs de croissance ou de récepteurs couplés aux protéines G qui reconnaissent des activateurs comme le fMLP [40].

Les enzymes de la famille des protéines kinase C (PKC) jouent un rôle important dans la cascade d'activation de la NADPH oxydase. Les neutrophiles expriment les isotypes α , β et δ qui sont tous capables de phosphoryler p47phox et d'induire l'activation de Nox2. La stimulation des récepteurs spécifiques mène à la phosphorylation des PKCs qui migrent vers la membrane [12]. Leur activité nécessite une liaison avec le Ca^{2+} (sauf la PKC δ) et le diacylglycérol (DAG), libéré par l'action des phospholipases ou phosphodiesterases, via leur domaines C1 et C2 respectivement (Figure 9) [12, 41]. L'activation des PKC peut aussi se faire indépendamment des récepteurs par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), un stimulus non physiologique qui induit une production intense d' O_2^{\bullet} [33].

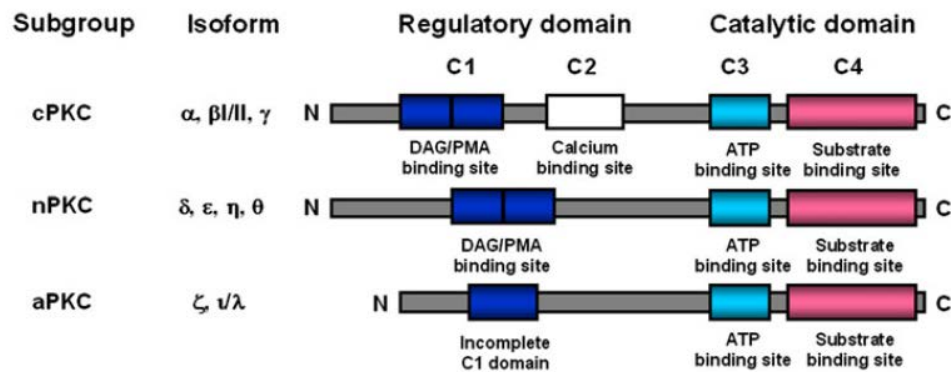


Figure 9. Représentation des protéines de la famille des PKC subdivisée en trois sous-familles : les PKC conventionnelles (cPKC), les nouvelles PKC (nPKC) et les PKC atypiques (aPKC). Les cPKC sont activées par le calcium, le diacylglycérol ou les esters de phorbol. Les nPKC répondent au DAG mais sont insensibles au calcium et les aPKC ne requièrent ni DAG ni calcium [12].

Une autre voie d'activation de la NADPH oxydase est celle de l'acide arachidonique (AA) et d'autres acides gras insaturés. L'activation de la phospholipase A2 cytosolique permet la libération d'AA quel que soit l'agoniste employé (fMLP, zymosan opsonisé² ou OpZ,...) (Figure 10) [7, 33]. L'AA participe à l'activation de diverses molécules de signalisation impliquées dans l'activation de la NADPH oxydase comme les PKCs. Il agit également de façon synergique avec la PKC en modifiant la conformation de p47phox afin de permettre son association avec le flavocytochrome b₅₅₈. L'action de l'AA favorise d'ailleurs une meilleure interaction entre p47phox et p22phox par rapport à la PKC seule [42]. L'AA agit aussi sur le fer du cytochrome en modifiant son état hexa-coordonné pour un état penta-coordonné, lui permettant de réagir avec l'O₂ (voir chap. Transfert des électrons p.41) [22] et augmente l'affinité du flavocytochrome b₅₅₈ pour le NADPH [43].

Le flavocytochrome b₅₅₈ des PMNs quiescents est principalement situé dans la membrane des granules et environ 10 à 20 % sont présents dans la membrane plasmique [22]. L'activation de Nox2 induit la fusion des granules avec la membrane plasmique et avec la membrane du phagosome permettant la libération d'O₂^{•-} dans le milieu extracellulaire et à l'intérieur du phagosome. La Nox2 peut également être activée dans les granules, sans fusion avec la membrane, menant alors à une production intracellulaire de ROS qui joue un rôle important pour la signalisation cellulaire [19]. L'activation est régulée à deux niveaux. Il y a premièrement une régulation spatiale consistant en la translocation de p47phox et

² Extrait de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et recouvert de sérum pour favoriser sa phagocytose par les neutrophiles.

p67phox vers la membrane et une régulation temporelle caractérisée par une perte au cours du temps de p47phox et p67phox dû à la dégradation et/ou la dissociation de ces protéines. Par contre, chez les personnes déficientes en MPO, on observe une prolongation de la flambée respiratoire [34].

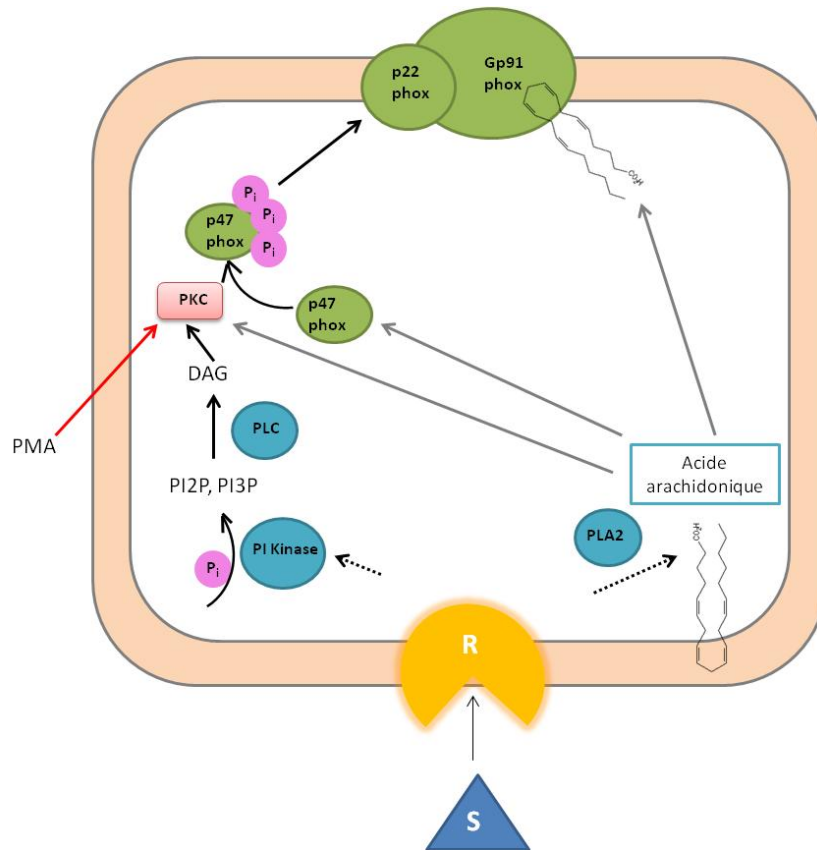


Figure 10. La stimulation des neutrophiles avec un stimulus S (fMLP, OpZ,...) mène à l'activation d'un récepteur R qui peut activer la NADPH oxydase via différentes voies. L'activation d'une phosphatidylinositol kinase (PI kinase) transforme le phosphatidylinositol en phosphatidylinositol 2- et 3-phosphate (PI2P, PI3P) qui sont clivés par la phospholipase C pour donner le diacylglycérol (DAG). Le DAG active la PKC qui intervient dans la phosphorylation de p47phox, permettant l'assemblage de la NADPH oxydase. Le PMA est un agent activateur indépendant des récepteurs qui permet une activation directe de la PKC. L'activation de la phospholipase A2 (PLA2) permet la libération de l'acide arachidonique (AA) qui a un effet direct sur l'activation de la NADPH oxydase. Adapté de Brandes et *al.* (2005)[40].

Activation in vitro de la NADPH oxydase

Une large variété de stimuli activent directement ou indirectement la NADPH oxydase. Le PMA et le fMLP sont souvent utilisés comme agents activateurs pour les études *in vitro*. Le PMA est un stimulus indépendant des récepteurs qui entre dans les cellules et active directement la PKC menant à l'activation de la NADPH oxydase (Figure 10).

Cette voie d'activation est souvent utilisée pour obtenir une production intense de ROS par les neutrophiles isolés. Parallèlement, le PMA active les mécanismes de dégranulation du neutrophile mais la MPO libérée suite à la stimulation des neutrophiles avec cet activateur peut être inhibée [3].

Le fMLP est un peptide synthétique qui mime l'effet de peptides membranaires d'origine bactérienne. C'est un stimulus des récepteurs couplés aux protéines G et une substance chimioattractante. La stimulation avec le fMLP requiert généralement un prétraitement des cellules pour initier le processus de stimulation. Dans la plupart des études, l'agent utilisé est la cytochalasine B (CB), une molécule agissant sur le cytosquelette qui permet de pré-activer les neutrophiles avant le traitement au fMLP [3, 7, 44].

Transfert des électrons

Le transfert des électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire se fait en sept étapes comme représenté sur la Figure 11. L'étape initiale est le transfert de deux électrons du NADPH vers le FAD oxydé, aussi appelé activité de diaphorase. Comme dans beaucoup de processus biologiques, le FAD permet de convertir un transfert simultané de deux électrons en un transfert d'un seul électron à la fois. La seconde étape est le passage d'un électron du FAD réduit (FADH_2) vers l'hème interne formant une semiquinone dérivée du FAD (FAD^\bullet). Les électrons sont ensuite transférés vers l'hème externe puis à l'oxygène pour former $\text{O}_2^{\bullet-}$. Les étapes 3 et 6 sur la Figure 11 sont défavorables au point de vue énergétique vu que le potentiel oxydo-réducteur ou rédox de l'hème interne est plus élevé que celui de l'hème externe. La fixation de l'oxygène au niveau de l'hème externe est ainsi nécessaire pour un transfert rapide des électrons car l'absence d'un accepteur final provoquerait une accumulation d'électrons au niveau de l'hème interne [19, 32].

L'activation de la chaîne de transport d'électron nécessite un changement de conformation du flavocytochrome b_{558} , permettant au NADPH d'atteindre le site actif et favorisant le transfert des électrons. Cette modification conformationnelle nécessite la liaison entre les protéines cytosoliques et le cytochrome et implique un changement au niveau de la membrane et des protéines elles-mêmes. Les protéines cytosoliques (p67phox et p47phox) jouent un rôle régulateur dans la fixation du NADPH sur son site de fixation et le transfert des électrons du NADPH vers le FAD et du FAD vers l'hème interne. Le cytochrome existe

sous trois états cinétiques : inactif, intermédiaire et actif. Dans l'état intermédiaire, les électrons vont du NADPH vers le FAD mais pas vers les hèmes ni l'oxygène. Le passage de l'état intermédiaire vers l'état actif est lent et est dépendant d'un ou plusieurs facteurs : le déplacement de résidus qui bloquent normalement l'activité de l'enzyme, le changement dans l'orientation relative des centres rédox et le changement de l'état de spin des hèmes. Le passage d'un ou des hèmes d'un état hexa-coordonné ou "low spin" à un état penta-coordonné ou "high spin" permet la fixation directe de l'oxygène avec l'hème et le fonctionnement de l'enzyme.

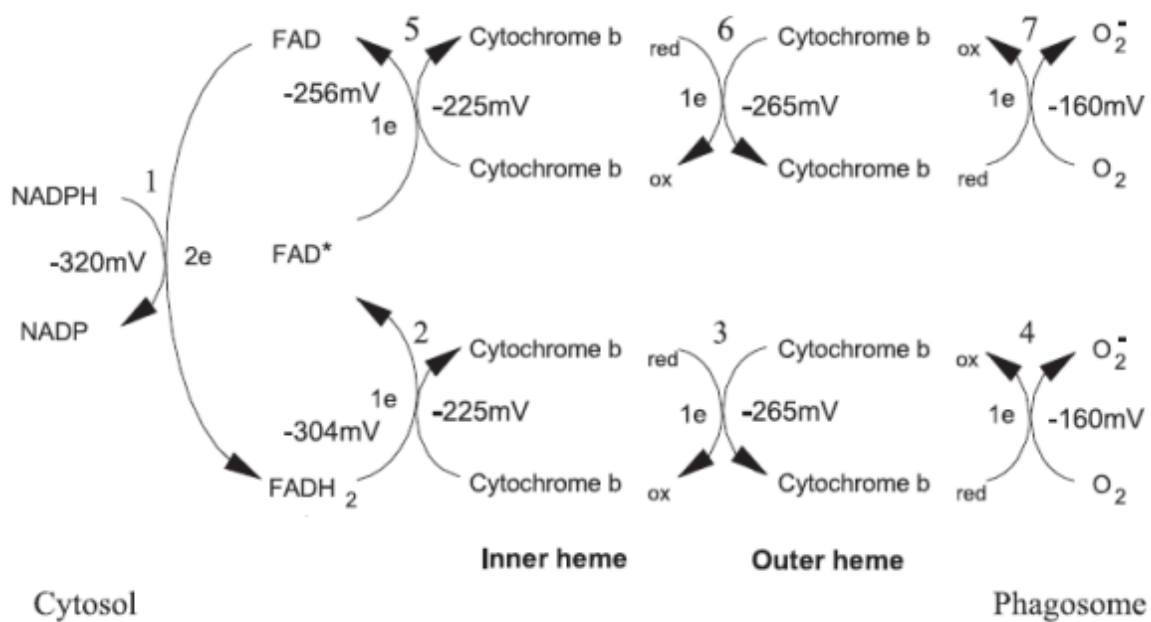


Figure 11. Processus du transfert d'électrons à travers le flavocytochrome b_{558} . Le transfert d'électrons débute avec le NADPH pour arriver jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène, afin de former l'anion superoxyde libéré dans le phagosome. "Inner heme" : hème interne; "outer heme" : hème externe [32].

Le transfert des électrons à travers la membrane sans transfert de protons serait responsable d'une dépolérisation de la membrane et il a été montré qu'une dépolérisation de + 190 mV est responsable d'une inactivation complète de l'enzyme [32]. La charge induite par la translocation des électrons à travers la membrane est ainsi compensée à 95 % par un flux de H^+ , passant au travers d'un canal membranaire, et n'entraînant pas de variation de pH car ils sont utilisés par l' $O_2^{\bullet-}$, pour former l' H_2O_2 . L'identité du canal est assez controversée : on suggère un canal traversant le cytochrome ou un canal "voltage-dépendant" ne faisant pas partie de l'enzyme. La compensation de charge ne se fait pas

uniquement avec des protons mais aussi à hauteur de 5 % avec des K^+ qui entraînent une augmentation de pH (Figure 12) [22, 32].

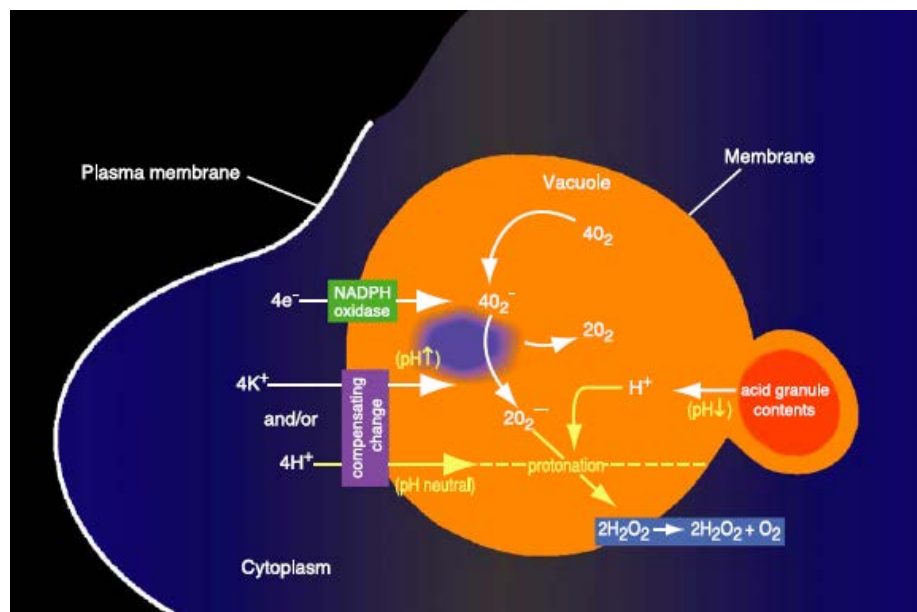


Figure 12. Représentation schématique des flux d'ions et de l'influence du pH sur le phagosome. Le contenu des granules cytoplasmique est maintenu à un pH d'environ 5. La libération du contenu de ces granules à l'intérieur du phagosome diminue le pH. La dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 consomme des protons et augmente le pH. Le passage des électrons à travers la membrane pour la production d' $O_2^{\bullet-}$ crée des charges qui sont compensées par le passage d'ions dont la nature affecte le pH du phagosome. Le passage de H^+ empêche l'utilisation de ceux qui se trouvent dans le phagosome et n'entraîne pas de variation de pH alors le passage d'ions comme les K^+ a tendance à faire augmenter le pH [32].

Mesure de l'activité de la NADPH oxydase en "Cell-free system"

Durant les années 80', plusieurs groupes ont découvert plus ou moins simultanément que l'AA pouvait induire l'activation de la NADPH oxydase et la production $O_2^{\bullet-}$ dans des lysats cellulaires de macrophages et de neutrophiles non activés. Dans ces études, les protéines cytosoliques et membranaires des lysats cellulaires sont séparées par ultracentrifugation. Ces protéines sont ensuite mélangées, en présence d'acide arachidonique ou d'un autre acide gras insaturé à longue chaîne, et la production d' $O_2^{\bullet-}$ est mesurée via la réduction du ferricytochrome C après l'ajout du cofacteur NADPH. Cette technique appelée "cell-free system" a par la suite été utilisée par tous les groupes travaillant sur la NADPH oxydase afin d'étudier le fonctionnement de l'enzyme, de disséquer ses différentes sous-unités et de déterminer l'identité des éléments régulateurs. La technique a été modifiée en remplaçant l'AA par d'autres agents comme le sodium dodécyl sulfate (SDS), le lithium dodécyl sulfate (LiDS) et plus tard par la PKC. Les agents amphiphiles peuvent jouer un rôle direct dans le

transfert des électrons soit en assistant les protéines cytosoliques dans le changement conformationnel du flavocytochrome b_{558} , soit en changeant la configuration des hèmes permettant une interaction avec l' O_2 . L'ajout de Guanosine 5'-[γ -thio]triphosphate (GTP- γ -S), un analogue non hydrolysable du GTP, a permis d'augmenter l'activité de la NADPH oxydase dans la plupart des systèmes et de démontrer la présence de protéines G dans le complexe enzymatique (Rac et Rap1a). Il a été montré que p40phox n'est pas indispensable en "cell-free system". D'ailleurs, à forte concentration, son ajout inhibe l'activité de la NADPH oxydase. L'évolution des "cell-free system" a continué avec le développement de systèmes purifiés ou semi-purifiés, grâce aux avancées dans la purification des sous-unités de l'enzyme, et de systèmes recombinants, où les protéines cytosoliques sont remplacées par un mélange de protéines recombinantes [11, 32, 33, 45, 46].

Inhibiteurs de la NADPH oxydase

Il existe de nombreux inhibiteurs de la NADPH oxydase qui sont utilisés et décrits dans la littérature mais la plupart d'entre eux manquent de spécificité ou leur mécanisme d'action reste mal connu et ils sont peu utilisables en thérapie (voir chap. Modulation de la NADPH oxydase p.55) [29, 47]. Dans ce travail, deux inhibiteurs ont été utilisés pour la validation des techniques de mesure de l'activité de la NADPH oxydase équine : le diphénylène iodonium (DPI) et le Gp91ds-tat.

Le diphénylène iodonium (DPI)

Le diphénylène iodonium ou DPI est un inhibiteur des flavoenzymes : il agit sur la NADPH oxydase en se fixant au flavocytochrome b_{558} , sur un site différent du NADPH, et extrait les électrons de la chaîne de transport pour former un radical dérivé du DPI. La fixation du DPI nécessite l'activation et le changement conformationnel de l'enzyme [48]. C'est un inhibiteur qui n'est pas spécifique de la NADPH oxydase et qui peut agir sur différentes chaînes de transport d'électrons comme celle de la NO synthase, de la xanthine oxydase ou du complexe I mitochondrial [19, 43]. Il est toxique *in vivo* et peut provoquer une myopathie mitochondriale caractérisée par une suppression de la phosphorylation oxydative. Il peut aussi avoir un effet sur des enzymes et protéines ne contenant pas de FAD mais dépendantes du NAD(P)H par un mécanisme mal connu (blocage de canaux à ions, inhibition d'enzymes de la voie des pentoses phosphates et du cycle de Krebs,...) [18, 49].

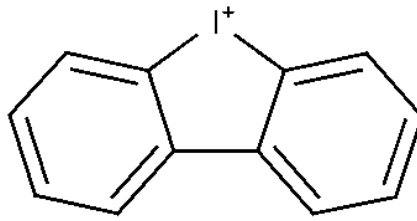


Figure 13. Structure chimique du diphénylène iodonium [50].

Le Gp91ds-tat

Le Gp91ds-tat (ds pour "docking sequence") est un peptide de 18 acides aminés qui comprend deux domaines fonctionnels. Le premier comprend neuf acides aminés d'une des boucles cytoplasmiques de Gp91phox (résidus 85 à 93) et le deuxième comprend neuf acides aminés de la protéine de surface tat ("Trans-Activator of Transcription") du virus HIV qui permet l'internalisation du peptide par les cellules. C'est un inhibiteur peu efficace qui, à 50 μM , n'inhibe que 25 % de la production des ROS par les neutrophiles [19]. Il agit en empêchant l'assemblage entre p47phox et Gp91phox et est donc peu spécifique vis-à-vis des différentes Nox, vu que la région ciblée est présente chez d'autres isoformes. Cette molécule n'agit pas en tant que "scavenger" de l'anion superoxyde et il n'y pas d'étude concernant l'influence de la portion tat sur l'assemblage de l'enzyme. Bien qu'on ne lui attribue pas d'effets secondaires, sa faible biodisponibilité orale (inactivation rapide par les enzymes digestives) et la possibilité d'induction d'une réponse immunologique chez les patients rendent son usage clinique assez limité [18, 19, 47, 51].

Les autres Nox

La famille des NADPH oxydases ou Nox comprend sept enzymes (Nox1 - 5) et deux enzymes d'origine thyroïdienne (Duox 1 et 2) représentées sur la Figure 14. Le rôle de ces enzymes diffère selon les tissus, les Nox phagocytaires (Nox2) ont principalement un rôle dans la défense immunitaire alors que les autres Nox sont importantes pour la signalisation cellulaire, la croissance et le métabolisme.

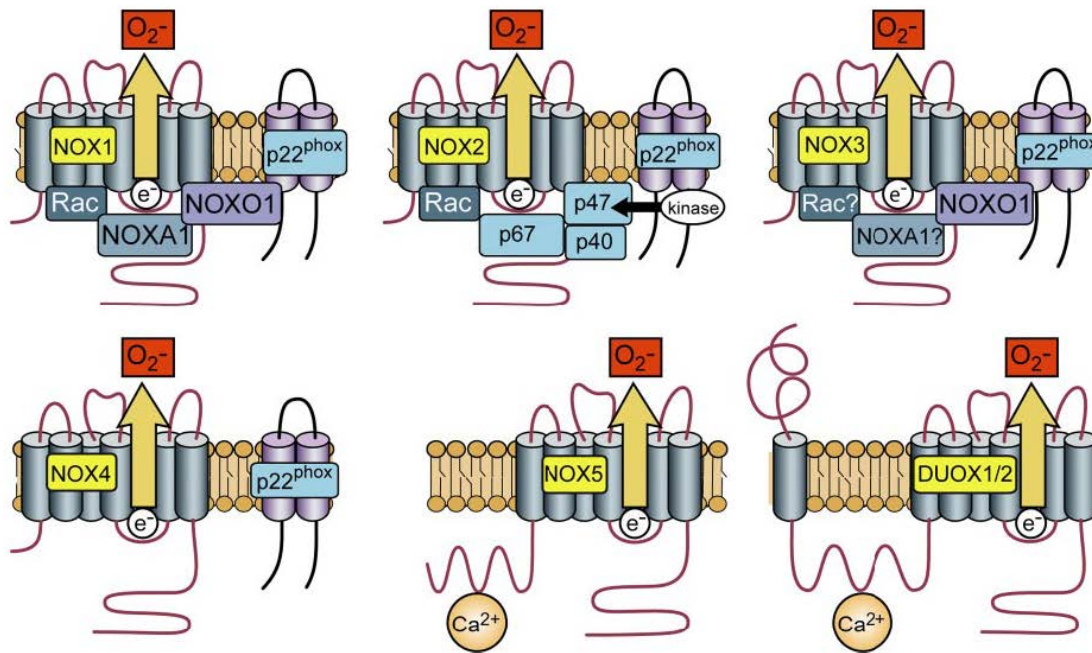


Figure 14. Représentation schématique des isoformes de la NADPH oxydase. Malgré leur structure et fonction similaires, les enzymes de la famille des Nox diffèrent par leur activation. Nox1 requiert les protéines NoxO1 (homologue de p47phox), NoxA1 (homologue de p67phox) et la petite protéine G Rac. Nox2 requiert les sous-unités p22phox, p40phox, p47phox, p67phox et Rac ainsi que la phosphorylation de p47phox. Nox3 requiert p22phox et NoxO1. La présence de NoxA1 peut être nécessaire selon les espèces et l'intervention de Rac dans l'activation est encore débattue. Nox4 requiert p22phox, son activation est constitutive et ne nécessite pas la présence d'autres sous-unités cytosoliques. Nox5, Duox1 et Duox2 sont activées par le Ca^{2+} et ne nécessitent pas la présence d'autres sous-unités. [19]

Nox1 est issue d'une duplication de gène assez récente et possède environ 60 % d'identité avec la Nox2. Son gène est également situé sur le chromosome X. On retrouve principalement ce sous-type dans l'épithélium du colon et, à moindre niveau, dans la prostate, l'utérus et les cellules musculaires lisses où elle jouerait également un rôle dans la défense immunitaire [18]. Nox3 est exprimée au niveau des tissus fœtaux, dans certaines lignées cancéreuses et dans l'oreille interne où elle jouerait un rôle dans la formation des otolithes³. Nox3 est également assez proche de Nox2 (56 % d'identité avec celle-ci) et serait constitutivement active. Nox4, issue d'une duplication de gène moins récente, avec seulement 39 % d'identité par rapport à Nox2, ne nécessite pas de sous-unités cytosoliques, ni la sous-unité Rac et serait constitutivement active. Nox4 est fortement exprimée dans les tubes proximaux du cortex rénal où elle joue un rôle régulateur dans la détection en

³ Cristaux de l'oreille interne permettant la détection d'accélération linéaires et de la gravité.

oxygène et dans la croissance cellulaire. Nox5 possède un domaine de fixation du Ca^{2+} . Sa régulation ne requiert pas de sous-unités cytosoliques ou la sous-unité p22phox, elle se fait par la fixation du Ca^{2+} . Nox5 est exprimée dans la rate, les ganglions lymphatiques et les testicules. Il existe cinq isotypes (Nox5 α , Nox5 β , Nox5 γ et Nox5s) qui diffèrent par leur domaine de fixation du Ca^{2+} [18]. Les NADPH oxydase thyroïdiennes, appelées Duox1 et 2 (pour "Dual Oxidase") sont trois fois plus grandes que la Nox2 (50 % d'identité). Elles possèdent un site de fixation au Ca^{2+} et un 7^{ème} domaine transmembranaire comprenant un domaine semblable aux peroxydases. Les Duox jouent un rôle important dans la synthèse des hormones thyroïdiennes pour lesquelles l'incorporation d'iode requiert la présence d' H_2O_2 et dans la défense immunitaire au niveau des muqueuses [11, 19].

Les autres enzymes de la flambée respiratoire

La myéloperoxydase

Généralités

La MPO est une enzyme dimérique présente en grande concentration (2 à 5 % en poids) dans les granules primaires des neutrophiles et, dans une moindre mesure, dans les monocytes qui la perdent durant leur différenciation en macrophages. Les dimères possèdent chacun un hème et ont la même activité que l'enzyme native, suggérant que les sites actifs fonctionnent séparément. Ils sont constitués d'une chaîne lourde (59 à 64 kDa) et d'une chaîne légère (15 kDa) et sont reliés entre eux par un pont disulfure (Figure 15). Lors de l'activation et de la dégranulation des neutrophiles, la MPO est libérée dans le phagosome ou à l'extérieur de la cellule où elle joue un rôle important dans l'immunité mais aussi en tant que messenger cellulaire via l'activation de facteurs de transcription (NF- κ B) et l'induction de l'apoptose par la voie des caspases. La MPO libérée peut être inactivée par des produits dérivés de la flambée respiratoire ou être phagocytée par des macrophages qui la reconnaissent via des récepteurs au mannose. Malgré son rôle dans l'immunité et, contrairement à la NADPH oxydase, une déficience partielle ou totale en MPO ne s'accompagne pas spécialement de symptômes cliniques, mais on observe une augmentation de la phagocytose et de la flambée respiratoire *in vitro* [1, 23, 52, 53].

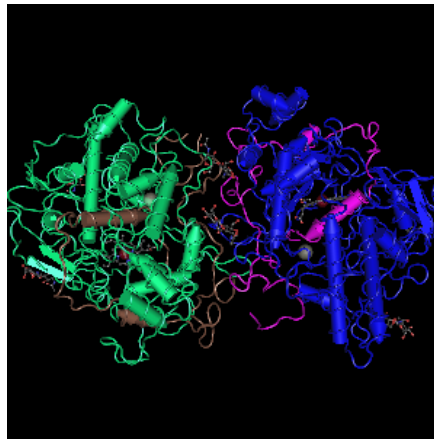


Figure 15. Structure homodimérique de la myéloperoxydase. Les chaînes légères sont représentées en brun et rose et les chaînes lourdes en vert et bleu. [54]

Activité de la myéloperoxydase

La MPO possède une activité de peroxydase et de chloration (Figure 16). Elle diffère des autres enzymes de la même famille par la grande réactivité de sa forme naturelle MPO-Fe (III) et de son composé I (Cdl). Le Cdl est de courte durée de vie et comprend une structure hémique Fe (IV) avec un radical centré sur un acide aminé de la protéine appelé "π cation radical". L'H₂O₂ réagit rapidement avec le Fe (III) de la MPO native pour former le Cdl qui présente un oxygène lié au fer de l'hème par une double liaison. Il réagit avec les ions chlorure pour former l'HOCl, principe actif de l'eau de javel, et reconstituer la MPO-Fe (III). Le Cdl peut aussi utiliser les ions bromure (Br⁻), iodure (I⁻) ou thiocyanate (SCN⁻) pour former les acides hypohalogénés correspondants, mais ce sont principalement les ions Cl⁻ qui sont utilisés car ils sont présents dans les cellules en concentration largement supérieure aux autres ions. Par le cycle de chloration de la MPO, peuvent dériver, indirectement, d'autres espèces intermédiaires hautement réactionnelles comme le Cl₂ ou le Cl[•]. La MPO a également un cycle d'activité peroxydasique. Le Cdl peut réagir avec des substrats réducteurs (DH) pour former le CdII et un radical dérivé de DH (D[•]). Le fer de l'hème du CdII est dans un état d'oxydation IV mais sans radical centré sur un acide aminé. Il retourne à l'état de MPO-Fe (III) par réduction avec un nouveau réducteur (DH) accompagné par la formation d'un autre radical D[•]. Les réducteurs intervenant dans ce cycle sont divers : les nitrites (NO₂⁻), l'ascorbate, l'urate, les cathécholamines, les oestrogènes, la sérotonine et la tyrosine. L'O₂^{•-} est aussi un réducteur mais la réduction par cette espèce est lente par rapport à d'autres réducteurs.

La MPO-Fe (III) peut réagir avec les produits de la flambée respiratoire pour former les composés (ou Cd) I, II et III (Figure 16). Le CdI peut être formé par la réaction entre la MPO et l'HOCl (voie réactionnelle annexe 2 sur la Figure 16). La réaction du CdI avec un excès d' H_2O_2 forme le CdII (voie réactionnelle annexe 1 sur la Figure 16). L' $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut réagir avec la MPO-Fe (III) pour former de façon réversible le CdIII, une oxyperoxydase, qui, un peu comme l'oxyhémoglobine, possède un oxygène attaché à son hème. Le CdIII est inactif, instable et a une très courte demi-vie. Il peut être reconverti en enzyme native par l'action d'agents comme l'acide ascorbique. A forte concentration, l' H_2O_2 peut aussi inhiber l'activité de la MPO. Cette inactivation pourrait se produire au début de la phagocytose lorsque le pH du phagolysosome est alcalin ou neutre, permettant un fonctionnement maximal de la NADPH oxydase et une quiescence de la MPO. On signale également une inhibition irréversible de la MPO avec destruction de l'hème par l'HOCl, suggérant un mécanisme d'autorégulation [1, 23, 52].

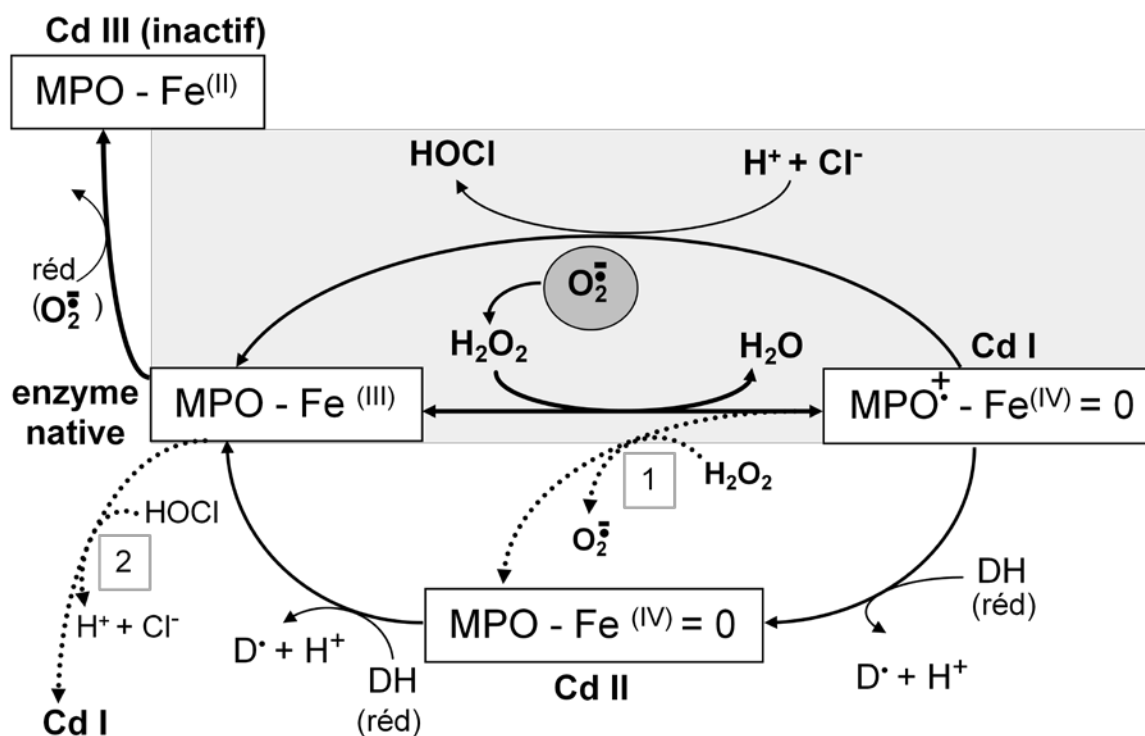


Figure 16. Etapes détaillées de l'activité de la MPO [MPO-Fe (III) : enzyme native] et de la formation des composés (Cd) intermédiaires. Cd I : composé portant un radical libre sur un acide aminé de la chaîne protéique, DH : substrat donneur d'électrons (réd : forme réduite), D• : radical dérivé de DH (par perte de H⁺). 1 et 2 : voies réactionnelles annexes. [1]

Il y a de nombreux paramètres qui régulent l'activité de la MPO : le pH (pH optimal de 5,5 pour l'activité de chloration et 7,4 pour l'activité peroxydasique), la production d' $O_2^{\bullet-}$ conduisant à la formation d' H_2O_2 , les concentrations en Cl^- , en réducteurs et en monoxyde d'azote (NO^{\bullet}). A faible concentration, le NO^{\bullet} active la MPO en réduisant le Cdl en CdII et le CdII en enzyme native alors qu'à plus forte concentration, il attaque l'hème et forme une MPO nitrosée inactive [1].

Réactivité des produits dérivés de l'activité de la MPO

Le système antimicrobien formé de la MPO, l' H_2O_2 et l' $HOCl$ a un rôle important dans l'immunité car il est toxique pour toute une série de microorganismes (bactéries, champignons, virus, protozoaires, amibes, helminthes), de toxines bactériennes (diphthérie ou tétanos), de cellules (cellules tumorales, granulocytes, lymphocytes, érythrocytes, spermatozoïdes) et de médiateurs de faible poids moléculaire (facteurs chimiotactiques, leukotriènes, inhibiteur de l' $\alpha 1$ protéinase). Son activité bactéricide comprend une étape de fixation sur la membrane bactérienne en de nombreux points pour détruire les structures polysaccharidiques résistantes aux enzymes protéasiques et hydrolytiques. Cette liaison permet à la MPO de s'attaquer de façon extracellulaire aux parasites et champignons trop volumineux pour être phagocytés. L' $HOCl$ est un oxydant fort capable d'oxyder et de chlorer de nombreuses molécules comme les thiols (-SH), les hèmes, les centres fer-soufre, les lipides insaturés, les bases nucléiques et de réagir avec les ions ammonium ou les amines pour produire des chloramines toxiques, comme la monochloramine (NH_2Cl), qui contribuent à l'activité antimicrobienne dans le phagosome. L' $HOCl$ réagirait avec l' $O_2^{\bullet-}$ pour former le radical hydroxyle. Par cette voie, la MPO serait responsable de la destruction des cellules tumorales. Le système MPO- H_2O_2 - $HOCl$ a généralement un rôle inhibiteur, mais, à faible concentration, il peut aussi activer certaines protéases (élastase, collagénase, gélatinase,...) et stimuler la sécrétion des plaquettes ou des mastocytes. Son rôle important dans l'immunité est démontré par certaines souches comme les staphylocoques qui produisent de la catalase et sont ainsi plus virulentes *in vivo* car elles utilisent l' H_2O_2 et perturbent l'activité de la MPO. La MPO peut également être captée et utilisée par les macrophages via leurs récepteurs au mannose ou enrober les microorganismes pour faciliter leur phagocytose.

Au cours d'une activation normale des neutrophiles, des quantités limitées de MPO sont libérées dans le milieu extracellulaire (estimées entre 10 à 15 %). Cependant, dans des conditions pathologiques, une activation continue et incontrôlée des neutrophiles et de la MPO peut causer des dégâts. L'addition de l' HOCl sur les doubles liaisons des phospholipides ou du cholestérol engendre la formation de chlorohydrines. La formation du dérivé 2-chlorohexadécanal (2-ClHDA) par chloration d'aldéhyde gras est un marqueur de maladie cardiovasculaire et d'athérosclérose. L' HOCl réagit avec les bases nucléiques pour former le 5-chlorouracyl et la 5-chlorocytosine, marqueurs de dommage à l'ADN impliqués dans le développement de cancers, ou la 3-chlorotyrosine et la 3,5-dichlorotyrosine retrouvées au niveau des lipoprotéines chez les personnes souffrant d'athérosclérose. Le HOCl oxyde le glutathion en dérivés qui ne peuvent plus être réduits par la glutathion réductase. Lorsque le cycle peroxydasique de la MPO est activé, il y a formation d'espèces radicalaires dérivées de la tyrosine et du nitrite. Ces espèces sont responsables de la peroxydation lipidique en initiant des réactions en chaîne. La MPO et ses produits dérivés sont donc fortement impliqués dans le développement et/ou l'aggravation de nombreuses pathologies, ce qui en fait une cible thérapeutique importante. La MPO est d'ailleurs considérée aujourd'hui comme un marqueur dans de nombreuses pathologies liées à l'activation des neutrophiles [1, 23, 44].

Mesure de l'activité de la MPO en "SIEFED"

La MPO étant une cible thérapeutique pour le traitement de nombreuses pathologies autant chez l'homme (maladies cardio-vasculaires, neurodégénératives,...) que chez le cheval (maladies gastro-intestinales, fourbure⁴,...), la mesure de son activité est nécessaire pour la recherche d'inhibiteurs de l'enzyme [1, 52]. La mesure de l'activité de la MPO par des méthodes classiques utilisant l' H_2O_2 et une sonde pour la détection de l'activité enzymatique entraîne certains inconvénients. Le substrat n'est pas spécifique de la MPO et peut être utilisé par d'autres peroxydases et certaines molécules présentes dans le milieu peuvent interférer avec la mesure (protéines, oxydants et réducteurs). Il est donc difficile de déterminer la cible des molécules testées. Notre équipe a développé et breveté une technique pour étudier les effets modulateurs de molécules de manière spécifique sur la

⁴ Maladie du sabot du cheval impliquant une vasoconstriction des capillaires sanguins, un afflux et une suractivation des neutrophiles pouvant mener à la perte du sabot.

MPO. Cette méthode appelée SIEFED ("Specific Immuno-Extraction Followed by Enzymatic Detection") [55], consiste en l'extraction immunologique de l'enzyme par des anticorps spécifiques immobilisés sur support solide et la mesure de l'activité de la MPO fixée sur ses anticorps. Elle permet, d'une part, d'extraire la MPO présente dans un milieu biologique complexe, d'éliminer le milieu, source d'interférences, par des lavages et de mesurer ensuite son activité. D'autre part, le SIEFED permet de tester l'effet de modulateurs sur l'activité de l'enzyme en les pré-incubant avec celle-ci puis en les éliminant avant la mesure de l'activité afin d'éviter les réactions entre le modulateur et la sonde, le(s) (co-)substrat(s) ou les produits d'activité enzymatique. De plus, cette technique peut être utilisée pour mettre en évidence des interactions entre le modulateur et l'enzyme. Le SIEFED, développé pour la MPO équine [56] et humaine [57], a déjà été utilisé pour la recherche d'inhibiteurs anti-catalytiques de la MPO [2, 58-60].

La NO synthase

Généralités

L'enzyme ubiquitaire NO synthase (NOS) produit le NO^\bullet , une molécule hautement diffusible produite dans tous les types cellulaires. Le NO^\bullet joue un rôle important dans la signalisation cellulaire, dans la vasodilatation, en tant que neurotransmetteur mais aussi dans l'immunité où il réagit avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former le peroxy-nitrite, un puissant bactéricide [23, 61, 62].

Il existe trois formes de NOS qui coexistent dans divers tissus. La NOS neuronale, ou nNOS, est présente au niveau des terminaisons ortho et parasympathiques neuronales, du réticulum sarcoplasmique et des mitochondries myocytaires. La NOS inducible (iNOS) est la seule forme indépendante du calcium. Elle se retrouve dans tous les types cellulaires après induction. Enfin, la NOS endothéliale (eNOS) est située dans les cellules endothéliales, les plaquettes et les myocytes. Les NOS sont des enzymes dimériques, chaque monomère contenant deux domaines : un domaine oxygénase en N-terminal et un domaine réductase en C-terminal reliés par un site central qui lie la calmoduline (Figure 17). Après liaison de la calmoduline et du calcium (sauf pour la iNOS), des électrons sont transférés depuis les co-facteurs (NADPH, FMN et FAD) du domaine réductase vers l'hème du domaine oxydase (Figure 17). En présence de tétrahydrobioptérine et d'oxygène, la NOS catalyse la conversion de la L-arginine en citrulline, accompagnée de la libération de NO^\bullet . Les NOS interagissent avec de

nombreuses protéines qui régulent son activité, sa distribution spatiale et sa proximité avec des régulateurs ou des cibles. Par exemple, la caveoline-I est un régulateur négatif qui interfère avec la liaison de la calmoduline [63-65].

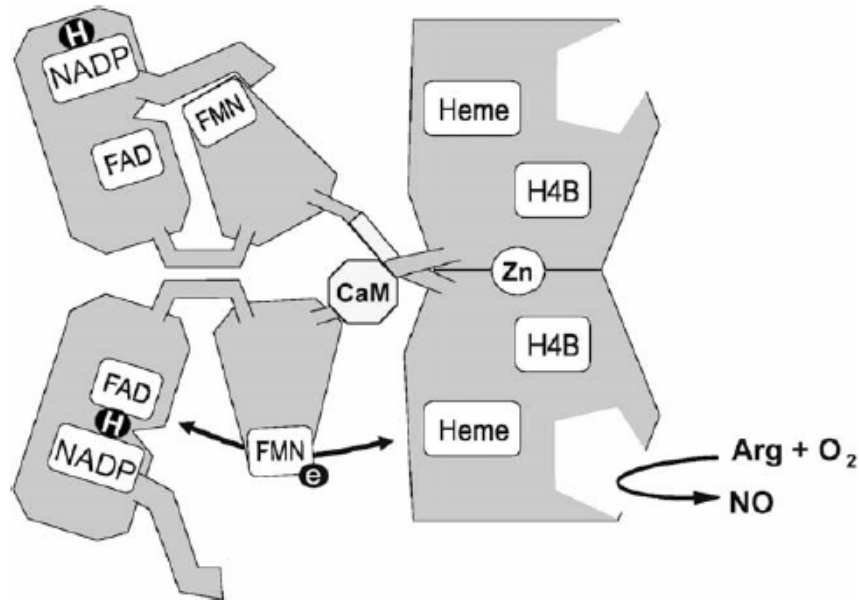


Figure 17. Structure de la NO synthase. CaM : calmoduline, H4B : tétrahydrobioptérine, Arg : arginine [64]

On retrouve une faible quantité de nNOS et de iNOS, après induction (par LPS, IL-1 β , TNF α , INF γ), dans divers compartiments cellulaires du PMN : la membrane nucléaire, le pore nucléaire, la membrane plasmique, les granules primaires, la vacuole de phagocytose, le cytosol et la mitochondrie. La nNOS est principalement présente (70 %) dans le cytosol et les organelles (excepté le noyau) et la iNOS dans le noyau (50 %). Dans les granules primaires, la proportion de nNOS et iNOS est la même [61, 62, 65].

Tout comme pour la MPO ou la NADPH oxydase, la iNOS peut jouer un rôle néfaste dans des processus d'inflammation chronique et dans les pathologies cardiovasculaires ou le cancer [62]. Elle est responsable de dégâts cellulaires dans des pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, le diabète de type II et la sclérose multiple où la iNOS est induite de façon importante [61]. On retrouve également de la nitrotyrosine dans les plaques d'athérome de personnes atteintes d'athérosclérose [26].

Réactivité du NO[•]

En présence d'O₂^{•-} produit par la NADPH oxydase, le NO[•] forme le peroxy-nitrite. Ce n'est pas un agent nitrant à lui seul, il nécessite la présence de métaux pour catalyser la réaction, mais c'est un oxydant puissant. Le peroxy-nitrite est capable d'oxyder de nombreux composés : sulfides, thiols, désoxyriboses, lipides, l'inhibiteur de l'alpha-1 protéinase et l'ascorbate. A pH acide, il se trouve sous sa forme protonée (ONOOH) qui se décompose pour former OH[•] et NO₂[•] [23, 61]. Le peroxy-nitrite peut se dissocier pour former le radical hydroxyle, très oxydant et le dioxyde d'azote (NO₂[•]) qui dimérise pour former le N₂O₄, un puissant agent nitrant qui peut former des dérivés nitrés à partir de thiol et d'hydroperoxyde. Cependant la formation de N₂O₄ se fait rarement car les concentrations en NO₂[•] sont très faibles. En effet, l'oxydation du NO[•] en NO₂[•] est possible mais probablement assez lente *in vivo* car il s'agit d'une réaction termoléculaire⁵ [25, 26].

Pathologies liées à une activation excessive des PMNs

Bien que les neutrophiles et leur réponse oxydante soient essentiels à la défense immunitaire innée, ils sont aussi impliqués dans des pathologies inflammatoires chroniques (arthrite rhumatoïde, syndrome de détresse respiratoire,...). Dans ce cas, ils sont responsables de dommages tissulaires dus à une dérégulation dans leur activation : activation prématurée durant leur migration, libération extracellulaire de produits microbicides ou suppression de l'arrêt de la réaction inflammatoire aiguë. Dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion, il se produit également un influx de PMNs dans la zone concernée et leur activation est responsable de dégâts cellulaires [14, 66].

Contrairement à d'autres espèces, le cheval est très sensible à l'inflammation [67]. Certaines pathologies équinées (maladies gastro-intestinales, fourbure,...) s'accompagnent d'un recrutement et d'une stimulation excessive des neutrophiles (PMNs) qui libèrent des ROS dans le milieu extracellulaire, pouvant entraîner des dégâts cellulaires secondaires. Par ailleurs, les pathologies intestinales étranglées sont les premières causes de mortalité chez le cheval suite au développement rapide d'un choc endotoxinique et d'une réaction inflammatoire excessive avec une dégranulation massive des neutrophiles et, *in fine*, une défaillance multi-organique [1, 2, 68]. Il existe donc un réel intérêt de trouver des molécules

⁵ Réaction à trois molécules.

naturelles ou de synthèse pouvant moduler l'activité oxydante des PMNs, soit en neutralisant les ROS qu'ils produisent, soit en agissant directement, et de manière réversible, sur les enzymes responsables de cette production. La NADPH oxydase du neutrophile est une cible thérapeutique privilégiée puisqu'elle produit la première espèce activée de l'oxygène, l' O_2^\bullet d'où dérivent d'autres ROS [1, 26, 66].

Modulation de la NADPH oxydase

Les inhibiteurs de la NADPH oxydase peuvent agir à différents niveaux. Ils peuvent bloquer ou perturber la chaîne de transport des électrons comme c'est le cas du DPI (voir chap. Le diphénylène iodonium (DPI) p.44) ou le VAS-2870 [18, 69] dont le mécanisme d'action est peu connu. Ils peuvent désassembler ou empêcher l'assemblage des sous-unités de l'enzyme comme le Gp91ds-tat (voir chap. Le Gp91ds-tat p.45), l'apocynine ou le Pefabloc qui empêchent l'association de p47phox à la membrane. L'effet de l'apocynine est lié à son oxydation par la MPO et c'est la forme oxydée de l'apocynine qui agit sur l'assemblage de la Nox2 [70]. L'apocynine est également un agent "scavenger" de l' H_2O_2 , mais elle stimule la production de ROS dans les cellules non phagocytaires [69]. Le Pefabloc (aussi connu sous le nom de fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyle ou AEBSF) est un inhibiteur des protéases à sérine active et un inhibiteur de Nox2. Il a une faible toxicité et agirait au niveau du flavocytochrome pour empêcher la translocation de p47phox et p67phox. Les inhibiteurs peuvent également réduire l'expression des gènes et des sous-unités de la NADPH oxydase et modifier l'enzyme ou ses activateurs [18, 69, 71].

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'inhibiteurs de la Nox2 utilisables en thérapie, souvent par manque de spécificité, de compréhension de leur mécanisme d'action ou parce qu'ils ne remplissent pas les critères de sécurité. La complexité de la recherche sur les inhibiteurs de la NADPH oxydase découle de sa structure multi-protéique qui fait intervenir de multiples interactions protéines-protéines et protéines-lipides, compliquant la détermination des cibles atteintes par les inhibiteurs. De plus l'enzyme peut être activée suivant différents stimuli et différentes voies qui peuvent aussi être considérés comme des cibles thérapeutiques [18, 29].

Des inhibiteurs potentiels de la Nox2 peuvent être des molécules d'origine naturelle, comme par exemple, les molécules phénoliques connues pour leurs propriétés de "scavenger" de

ROS mais pouvant aussi agir sur les cascades d'activation ou les enzymes impliquées dans la production des ROS. Parmi ces molécules naturelles, citons l' α -tocophérol, le resvératrol ou la curcumine qui modulent l'activité de la NADPH oxydase en inhibant la PKC et l'apocynine ou les catéchines qui empêchent l'assemblage de l'enzyme [18, 69, 72]. De plus, Davalos et al. (2009) ont montré que la consommation de polyphénols contenus dans le jus de raisin diminuait l'activité et l'expression de la Nox2 et plus généralement l'activation excessive des PMNs observées dans des conditions inflammatoires tout en préservant leurs fonctions immunitaires [73].

Depuis plusieurs années, notre groupe s'intéresse à la curcumine, dont les propriétés sont multiples, et qui réduit l'activité oxydante des neutrophiles non seulement grâce un effet "scavenger" des ROS mais aussi en inhibant l'activité de la MPO [2]. Des effets bénéfiques d'une forme soluble de la curcumine, le NDS27 (voir chap. Le NDS27 p.59), ont été montrés *in vivo* dans le traitement d'obstruction récurrentes des voies respiratoires (RAO), une pathologie inflammatoire, proche de l'asthme humain, et caractérisée par une augmentation du nombre de PMNs et une activation de ceux-ci au niveau des voies pulmonaires basses. L'administration de NDS27 par aérosol aux chevaux réduit notamment l'afflux de neutrophiles dans les voies respiratoires [4, 74].

La curcumine et le NDS27

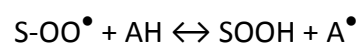
La curcumine

La curcumine ou le diféruloylméthane est le pigment principal présent dans le curcuma, une poudre issue des rhizomes de *Curcuma longa* (famille des *Zingiberaceae*) (Figure 18). Elle est utilisée depuis des siècles dans la médecine indienne et chinoise pour le traitement des pathologies inflammatoires. C'est une molécule lipophile, comprenant deux groupements phénoliques, qui possède une large gamme d'activités biologiques comprenant une activité anti-inflammatoire, antioxydante, anti-cancéreuse, anti-microbienne, antispasmodique, anticoagulante, hépato-protective, hypocholestérolémiante et cicatrisante [75-77].

L'efficacité de son activité anti-oxydante est comparable, voire meilleure, à celle de la vitamine C ou E [75, 76]. Elle inhibe l'activation des neutrophiles en agissant sur la production des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , -2, -6, -8 et -12 et en inhibant des facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1, PPAR γ et STAT3) qui régulent la

transcription des gènes des médiateurs pro-inflammatoires et des antioxydants protecteurs. La curcumine inhibe aussi l'activité de nombreuses enzymes comme les cytochromes p450, la cyclooxygénase (COX2), les PKCs, les protéines tyrosine kinases, la NO synthase inducible (iNOS),... La curcumine affecte le métabolisme de l'acide arachidonique en bloquant la phosphorylation des phospholipases cytosoliques (PLA2) et en diminuant l'expression des COX2. Elle agirait sur la diminution de l'expression de la iNOS et la COX2 via son effet sur le facteur de transcription NF- κ B en bloquant la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B, empêchant ainsi la libération du facteur de transcription. Son caractère lipophile lui permet également de s'accumuler dans les biomembranes où elle peut agir directement sur les protéines membranaires comme les pompes à ions, les récepteurs et les canaux [75, 77, 78].

La curcumine est aussi un puissant "scavenger" des ROS dont l'O₂^{•-}, le OH[•], l'H₂O₂ et NO₂[•]. En s'attaquant aux radicaux peroxydes (ROO[•]), elle peut arrêter la peroxydation lipidique. Elle est d'ailleurs utilisée dans l'industrie alimentaire pour améliorer la qualité et la stabilité des produits. Ses propriétés antioxydantes sont liées au transfert d'un atome d'hydrogène à partir d'un groupement phénolique : elle forme alors un intermédiaire radicalaire dérivé de la curcumine qui se stabilise en dimérisant ou en réagissant avec une autre espèce radicalaire (Équation 4 et Équation 5) [31]. De manière générale, les antioxydants phénoliques stabilisent souvent les radicaux libres par un mécanisme de transfert électronique : la capacité de donner des électrons (espèces réductrices) est associée avec l'activité antioxydante de ces composés. La curcumine peut aussi chélater les ions ferreux (impliqués dans la formation de ROS) via ses groupements hydroxyles et méthoxyles, lui procurant également une bonne capacité antioxydante.



Équation 4. Substance oxydée S-OO[•] réagissant avec un composé antioxydant phénolique AH pour former une espèce radicalaire dérivée de A (A[•]) [31].



Équation 5. Réaction entre le radical dérivé de l'antioxydant (A[•]) avec un radical X (qui peut être un deuxième radical A[•]), pour former un composé non radicalaire [31].

La prévention et le traitement des pathologies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, les ulcères, les pancréatites ou les maladies neurodégénératives (ex. Alzheimer) par la curcumine semblent prometteurs. Elle est consommée depuis des siècles dans les pays

asiatiques et ne semble pas présenter de toxicité. De plus, elle est apparue comme extrêmement sûre dans les nombreux essais cliniques, même à forte concentration [76], mais certaines études ont quand même montré des effets secondaires. La curcumine entraînerait la fragmentation de l'ADN et causerait des dommages aux bases nucléiques *in vitro*, lorsqu'elle est mise en présence de cuivre et de cytochrome p450. Il a aussi été démontré que la curcumine inhibe l'activité de certains médicaments utilisés en chimiothérapie et interfère avec leur absorption [77].

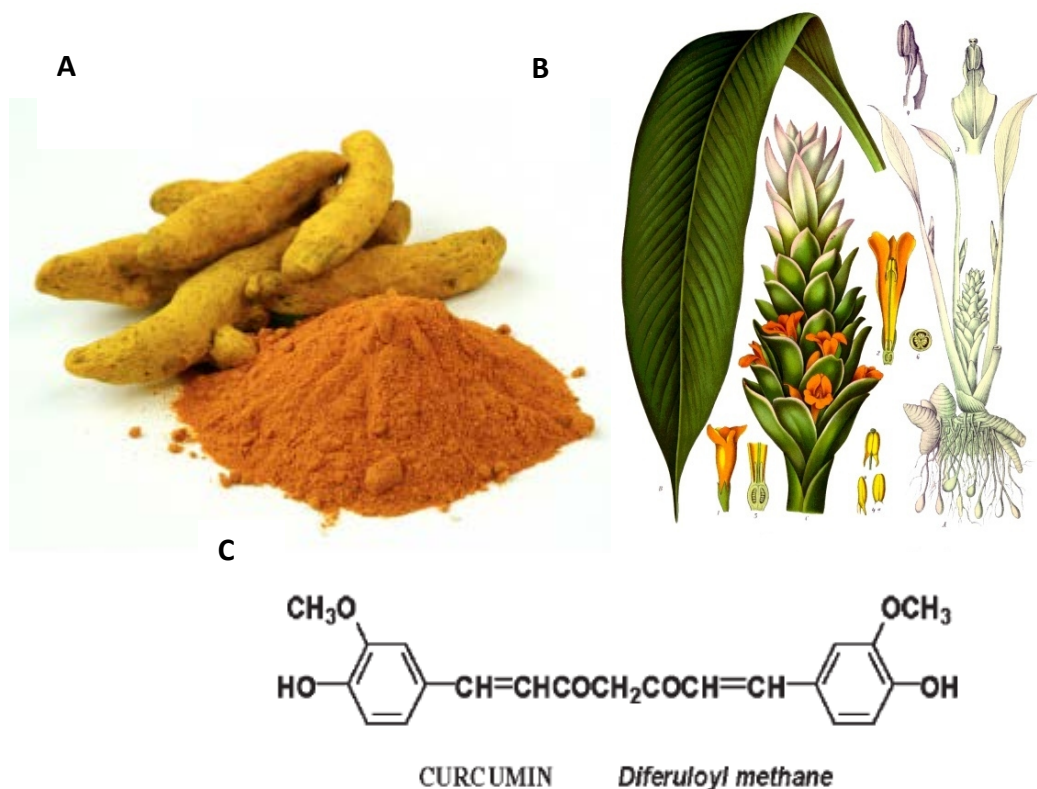


Figure 18. (A) Rhizome et poudre de curcuma, (B) *Curcuma longa* et (C) structure chimique de la curcumine [75].

La curcumine présente l'inconvénient majeur d'avoir une faible résorption intestinale après administration orale, et donc une faible biodisponibilité systémique, ainsi qu'une métabolisation systémique importante. Cela est sans doute dû au fait qu'il s'agit une molécule quasiment insoluble dans l'eau et qu'elle est rapidement métabolisée, conjuguée dans le foie et éliminée. Les métabolites formés sont la dihydrocurcumine et la tétrahydrocurcumine qui sont ensuite transformés en conjugués glucuronides⁶. De plus la

⁶ Conjugaison des métabolites de la curcumine avec l'acide glucuronique afin de permettre leur élimination.

curcumine ne possède pas les propriétés physico-chimiques nécessaires pour le développement d'un médicament, rendant son usage thérapeutique limité. C'est pourquoi les chercheurs investiguent les bénéfices de complexer la curcumine avec d'autres molécules pour augmenter sa biodisponibilité [75, 77-80].

Le NDS27

C'est pour pallier les inconvénients de la curcumine classique que notre équipe a développé le NDS27 (Figure 19), un complexe stable et soluble dans l'eau, formé d'un sel de curcumine, le lysinate de curcumine, et d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD) [81].

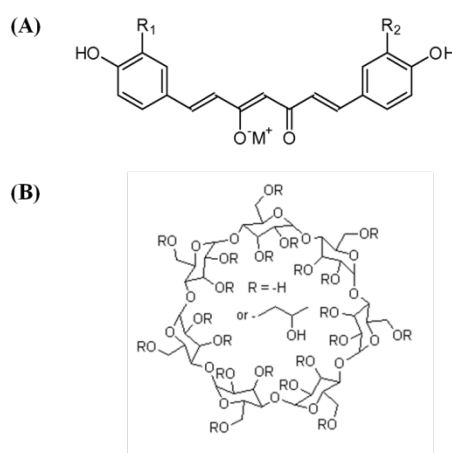


Figure 19. Le NDS27 est une combinaison de lysinate de curcumine (A) avec l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (B) [81].

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques (Figure 19) avec une surface externe hydrophile et une cavité centrale lipophile permettant de réaliser des complexes d'inclusion avec des molécules peu solubles. La cavité lipophile de la cyclodextrine protège la molécule de l'environnement aqueux alors que la surface externe hydrophile lui procure une bonne solubilisation. Une ou deux molécules peuvent former des complexes avec une, deux ou trois cyclodextrines (Figure 20). La formation de complexes d'inclusion peut se faire avec des molécules liquides, solides ou gazeuses. La principale force motrice qui mène à la formation des complexes est la libération hautement énergétique des molécules d'eau présentes dans la cavité des cyclodextrines. Ces molécules sont remplacées par des molécules plus hydrophobes qui forment diverses liaisons non covalentes (hydrophobes, Van der Waals,...) à l'intérieur de la cavité amenant la cyclodextrine dans un état plus stable et de plus faible énergie.

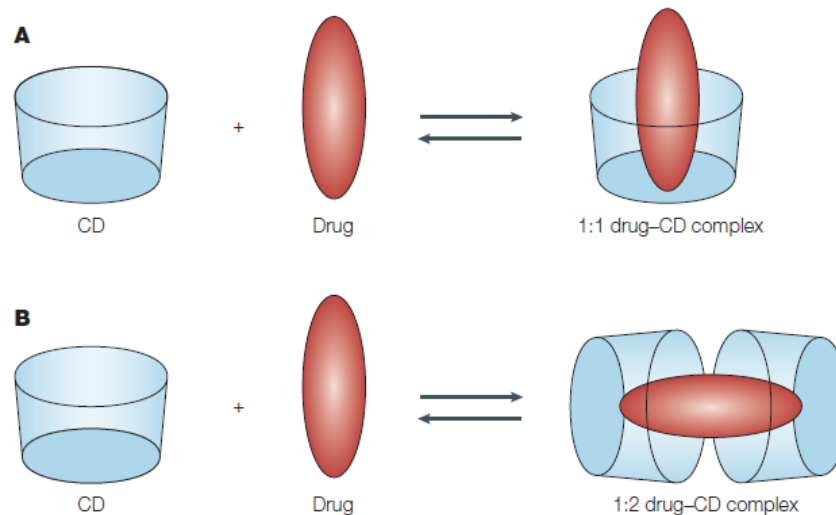


Figure 20. Illustration schématique de l'association d'une cyclodextrine libre (CD) avec une molécule ("drug") pour former un complexe molécule-cyclodextrine ("drug-CD complex"). (A) : complexe molécule-cyclodextrine (1:1) et (B) : complexe molécule-cyclodextrine (1:2) [82].

Les cyclodextrines utilisées dans ce travail comprennent sept (hydroxypropyl- β -cyclodextrines) ou huit monomères de glucose (γ -cyclodextrines ou γ -CD). La taille des cyclodextrines reste la même, le nombre de glucose détermine uniquement le diamètre de la cavité interne. Les β -cyclodextrines sont les plus utilisées dans les préparations pharmacologiques et probablement les plus étudiées chez l'homme. Elles sont peu résorbées au niveau intestinal après une administration orale (1 à 2 %) mais ne sont pas métabolisées dans l'intestin. Les γ -CD sont probablement les cyclodextrines les moins toxiques, mais elles ne sont quasiment pas résorbées au niveau intestinal (0,1 %) et sont rapidement et totalement dégradées en glucose par les bactéries intestinales. Par contre, les cyclodextrines sont résistantes à la dégradation par les enzymes humaines. Au niveau de leur solubilité, l'HP β CD est plus soluble que la γ -CD (60 % masse/masse contre 26 % pour la γ -CD).

Les cyclodextrines sont largement utilisées dans la solubilisation et la stabilisation de principes actifs en pharmacologie (protection contre l'oxydation, les UV, la chaleur,...). Elles augmentent également le passage de molécules à travers les biomembranes. Leurs nombreuses propriétés font qu'elles sont également utilisées dans d'autres domaines comme l'industrie cosmétique et alimentaire. Les cyclodextrines sont également connues pour leur capacité d'extraction du cholestérol des biomembranes, le degré d'extraction

dépendant du type de cyclodextrine utilisée. Parmi les différentes cyclodextrines, les β -cyclodextrines sont considérées comme les meilleurs accepteurs de stérol [80, 82-84].

Buts du travail

La NADPH oxydase des neutrophiles est considérée comme une cible thérapeutique importante et la modulation de son activité permettrait d'affaiblir la réponse excessive des neutrophiles qui accompagne certaines pathologies chez le cheval. Cependant, les inhibiteurs de la Nox2 actuellement décrits dans la littérature sont peu utilisés en thérapie par manque de spécificité ou parce qu'ils ne remplissent pas les critères de sécurité. Les études précédemment réalisées au CORD sur les inhibiteurs potentiels de la Nox2 étaient principalement indirectes et ne permettaient pas de déterminer la cible des molécules (récepteurs, cascade de signalisation, enzymes productrices de ROS,...). Ces études ont démontré que la curcumine était une molécule intéressante pour inhiber la production de ROS et la libération de MPO par les neutrophiles stimulés mais des questions restaient en suspens concernant son mode d'action et son activité sur la NADPH oxydase.

Le premier objectif de notre travail a été de mettre au point et de valider de nouvelles méthodes *in vitro* pour la mesure de l'activité de la NADPH oxydase équine. Nous avons développé deux méthodes. La première méthode est un "cell-free system", consistant en la reconstitution *in vitro* de la NADPH oxydase équine après avoir séparé ses sous-unités cytosoliques et membranaires. La deuxième méthode, appelée EquiNox2, est une technique originale jamais décrite dans la littérature. Elle est basée sur le "cell-free system" et consiste en la fixation de l'enzyme totale reconstituée ou de ses sous-unités membranaires sur un support solide, suivie de la mesure de l'activité enzymatique. Le "cell-free system" et l'EquiNox2 ont ensuite été validés avec des inhibiteurs connus de la NADPH oxydase (le DPI et le Gp91ds-tat) et appliqués avec des molécules ayant un intérêt clinique pour la modulation de la réponse inflammatoire du cheval.

Le deuxième objectif de ce travail a été de déterminer l'effet de la curcumine et principalement de sa forme soluble, le NDS27, sur la réponse oxydante des neutrophiles afin de préciser quelles sont les cibles atteintes par cette molécule et quel est son mode de fonctionnement. L'effet du NDS27 a été étudié sur l'activité de deux des enzymes impliquées dans la flambée respiratoire, la myéloperoxydase et la NADPH oxydase, avec une recherche plus détaillée sur le mode de fonctionnement, le processus d'activation et l'activité de la NADPH oxydase. Ces recherches ont été rendues possibles grâce au développement de nos nouvelles techniques.

Présentation synoptique des résultats

Les résultats présentés dans ce travail sont articulés autour de deux axes : (1) la mise au point et la validation de deux nouvelles techniques, le "cell-free system" et l'EquiNox2 pour mesurer l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles équins et (2) l'étude de l'activité d'un nouveau dérivé soluble de la curcumine, le NDS27, sur la réponse oxydante des neutrophiles et l'activité de la NADPH oxydase.

Mise au point d'outils pour la mesure de l'activité de la NADPH oxydase des PMNs équins

Le « cell-free system » (voir Article II p.109)

Optimalisation du dosage

Le "cell-free system" est une technique consistant à isoler séparément les sous-unités cytosoliques et membranaires de la NADPH oxydase, puis à les rassembler par activation *in vitro* et à mesurer son activité. Il existe une technique publiée par Heyneman et *al.* (1984) [85] pour mesurer l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles équins, mais qui n'a pas donné de résultats concluants dans nos conditions. Nous avons donc transposé des techniques permettant de mesurer l'activité de l'enzyme humaine [86, 87], bovine [88] ou porcine [89] pour la Nox2 équine.

Le développement du "cell-free system" équin a nécessité la mise au point d'une technique de séparation des protéines cytosoliques et membranaires des PMNs par ultracentrifugation, réalisée lors de travaux antérieurs [90]. L'assemblage du complexe enzymatique se fait grâce à l'utilisation de deux activateurs : un sel dérivé de l'acide arachidonique, l'arachidonate de sodium, et le dérivé non hydrolysable du GTP, le GTP- γ -S. L'ajout de ces activateurs, combiné à une agitation des protéines membranaires et cytosoliques, permet l'assemblage du complexe. L'activité enzymatique est mesurée grâce à l'ajout du co-substrat de l'enzyme, le NADPH, et est suivie via la réduction du ferricytochrome C par les $O_2^{\bullet-}$ produits. L'optimalisation du "cell-free system" a consisté en la détermination des concentrations optimales en protéines cytosoliques et membranaires et en activateurs afin d'obtenir une production maximale d' $O_2^{\bullet-}$.

La concentration optimale en protéines a été déterminée en fixant la quantité de membranes à 2 μg et en augmentant progressivement la quantité de protéines cytosoliques. Nous avons déterminé que l'activité maximale de l'enzyme se produit pour 50 μg de protéines cytosoliques, ce qui donne un rapport de 25 entre protéines cytosoliques et membranaires (Figure 21A, bleu). Il a été démontré que la concentration en arachidonate de sodium est fortement dépendante de la concentration réelle en sous-unités cytosoliques et membranaires présentes dans les extraits cellulaires [88]. Comme nous travaillons avec des extraits non purifiés, contenant l'ensemble des protéines du PMN, les concentrations en sous-unités varient d'un lot de neutrophiles à l'autre et la concentration optimale en arachidonate (généralement située entre 50 et 80 μM) doit être déterminée pour chaque lot. Nous avons déterminé qu'une concentration de 2 μM en GTP- γ -S était favorable à une activité maximale de l'enzyme (Figure 21A, vert). L'ajout de cet activateur permet l'activation des protéines G (Rac et Rap1A) de la Nox2 [45]. Le GTP- γ -S n'était d'ailleurs pas utilisé par l'équipe de Heyneman *et al.* (1984) [85], ce qui peut expliquer pourquoi nous n'avons pas obtenu de résultat avec cette technique.

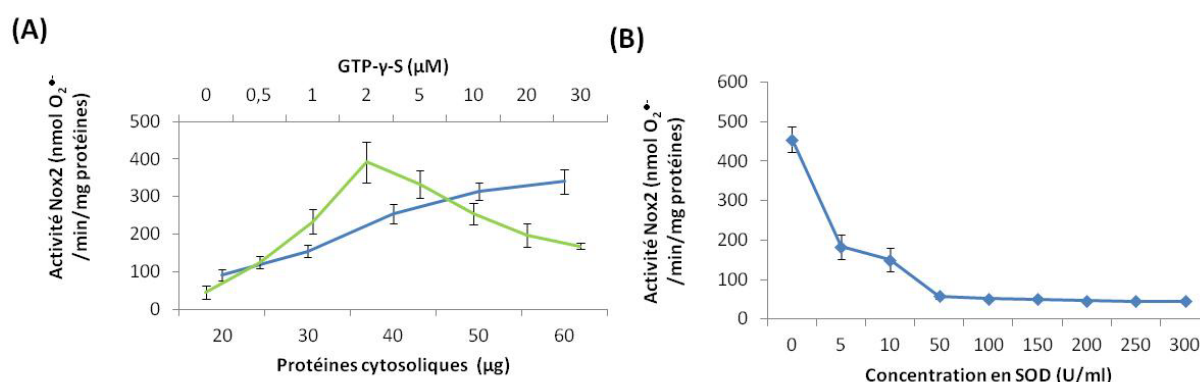


Figure 21. (A) Activité de la NADPH oxydase en fonction de la concentration en protéines cytosoliques (bleu) ou de la concentration en GTP- γ -S (vert) pour une quantité fixée de protéines membranaires (2 μg). (B) Activité de la NADPH oxydase en fonction de la concentration en SOD (de 0 à 300 μM). Moyenne \pm erreur standard, $n \geq 8$.

Validation du dosage

Afin d'obtenir une réponse spécifique de l'O₂^{•-}, nous avons utilisé la superoxyde dismutase comme contrôle. La SOD catalyse la dismutation de l'O₂^{•-} en H₂O₂, ce dernier ne réduisant pas le ferricytochrome C. La SOD diminue le signal lié à la production d'O₂^{•-} jusqu'à atteindre une phase plateau à partir de 50 U/ml (Figure 21B). Le signal qui subsiste en présence d'une concentration égale ou supérieure à 50 U/ml en SOD est dû à une réduction du

ferricytochrome C non spécifique de l'O₂^{•-}. En réalisant, en parallèle, et pour chaque test, un contrôle en présence d'une concentration de 200 U/ml en SOD et en soustrayant ce signal du signal obtenu sans SOD, nous arrivons à une mesure spécifique de l'O₂^{•-}.

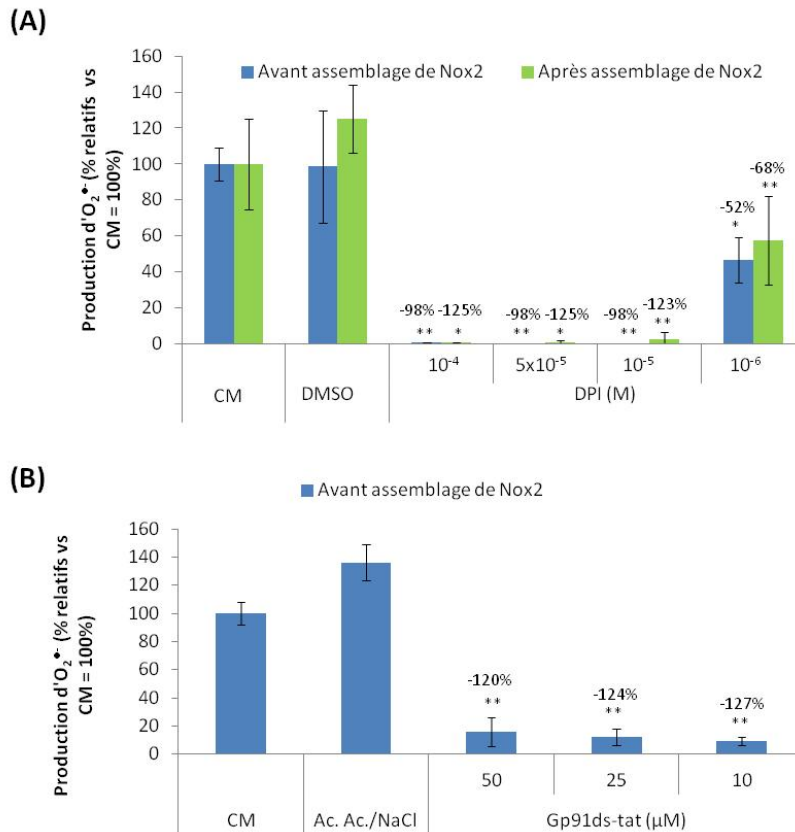


Figure 22. Effets du DPI (A) et du Gp91ds-tat (B) sur l'assemblage et l'activité de la NADPH oxydase déterminés par la mesure de la production d'O₂^{•-} en "cell-free system". Le DPI et Gp91ds-tat sont ajoutés avant (bleu) ou après (vert) l'assemblage de la NADPH oxydase. Les pourcentages d'inhibition indiqués au dessus de chaque colonne sont calculés par rapport au contrôle éthanol (ETOH) pour le DPI et la solution d'acide acétique NaCl (Ac.Ac./NaCl) pour le Gp91ds-tat. **p<0,001, *p<0,05. CM: complexe reconstitué sans DPI ou Gp91ds-tat. Moyenne ± erreur standard, n≥5.

Notre "cell-free system" a ensuite été validé par l'utilisation de deux inhibiteurs connus de la NADPH oxydase : le Gp91ds-tat et le DPI. Ces molécules peuvent être testées dans deux conditions différentes. Soit elles sont ajoutées avant de stimuler l'assemblage. Dans ce cas, la molécule aura un effet si elle empêche l'assemblage de l'enzyme ou si elle agit sur le complexe reconstitué. Soit les molécules sont ajoutées après l'assemblage de l'enzyme et auront uniquement un effet si elles agissent sur le complexe entier. En réalisant, pour chaque molécule, ces deux variantes de l'expérience on sait déterminer si elles agissent plutôt sur l'assemblage de l'enzyme ou sur le complexe reconstitué. Le DPI, un inhibiteur des flavoenzymes, inhibe de façon significative la production d'O₂^{•-} (de 10⁻⁴ à 10⁻⁶ M) lorsqu'il est

ajouté avant ou après l'assemblage (Figure 22A). Cette molécule peut donc agir sur l'activité du complexe reconstitué indépendamment de son assemblage. Ces résultats sont en accord avec l'activité du DPI décrite dans la littérature : il empêche l'activité de l'enzyme en interférant avec la fixation du NADPH et en extrayant les électrons de la chaîne de transport du flavocytochrome b_{558} pour former un radical [50, 91]. Nous avons montré que le Gp91ds-tat, un inhibiteur de l'assemblage de la Nox2, diminue de façon significative (aux concentrations de 10 à 50 μM) l'activité de la NADPH oxydase équine lorsqu'il est ajouté avant l'assemblage (Figure 22B). Cela implique que la région responsable de l'interaction entre la Gp91phox et la p47phox de la Nox2 équine est conservée par rapport à d'autres espèces comme l'homme, la souris ou le rat pour lesquels l'efficacité du Gp91ds-tat a déjà été démontrée [51, 92-94].

Etude préliminaire de la curcumine et du resvératrol

Nous avons réalisé une étude préliminaire sur des molécules d'origine naturelle, le resvératrol et la curcumine, reconnues pour leurs propriétés anti-inflammatoires et pouvant moduler la réponse oxydante des PMNs équins [2, 59]. Le "cell-free system" a été combiné avec une technique de chimiluminescence (CL), utilisant la lucigénine, qui permet de mesurer la production d' O_2^{\bullet} par les PMNs isolés. Par CL, nous avons montré que le resvératrol et la curcumine inhibent la production d' O_2^{\bullet} par les PMNs stimulés au PMA mais que seule la curcumine conserve un effet inhibiteur après son élimination de la préparation cellulaire [95]. La curcumine semble donc s'incorporer facilement dans les PMNs ou du moins interagir avec leurs membranes, suggérant une action potentielle sur des enzymes intracellulaires impliquées dans réponse oxydative des PMNs. En "cell-free system", nous avons étudié l'effet de ces deux molécules sur l'activité de la Nox2 équine. Le resvératrol inhibe de manière dose-dépendante (de 10^{-5} à 10^{-4} M) l'activité de la Nox2 et ce, de façon plus importante lorsqu'il est ajouté après l'assemblage, suggérant qu'il aurait plutôt un effet sur l'enzyme reconstituée (Figure 23B). Lorsque les molécules sont ajoutées avant l'assemblage de l'enzyme, c'est la curcumine qui est la plus efficace pour inhiber l'activité de la NADPH oxydase (Figure 23A). La curcumine interférerait avec l'assemblage de la Nox2, ce qui, à notre connaissance n'a jamais été démontré. Cependant, il ne faut pas oublier que ces deux polyphénols sont également connus pour leurs propriétés de "scavenger" [79, 96] (voir

chap. Systèmes de protection contre les ROS p.29) et que leurs effets observés en CL ou en "cell-free system" peuvent être partiellement dus à une stabilisation de l' $O_2^{\bullet-}$.

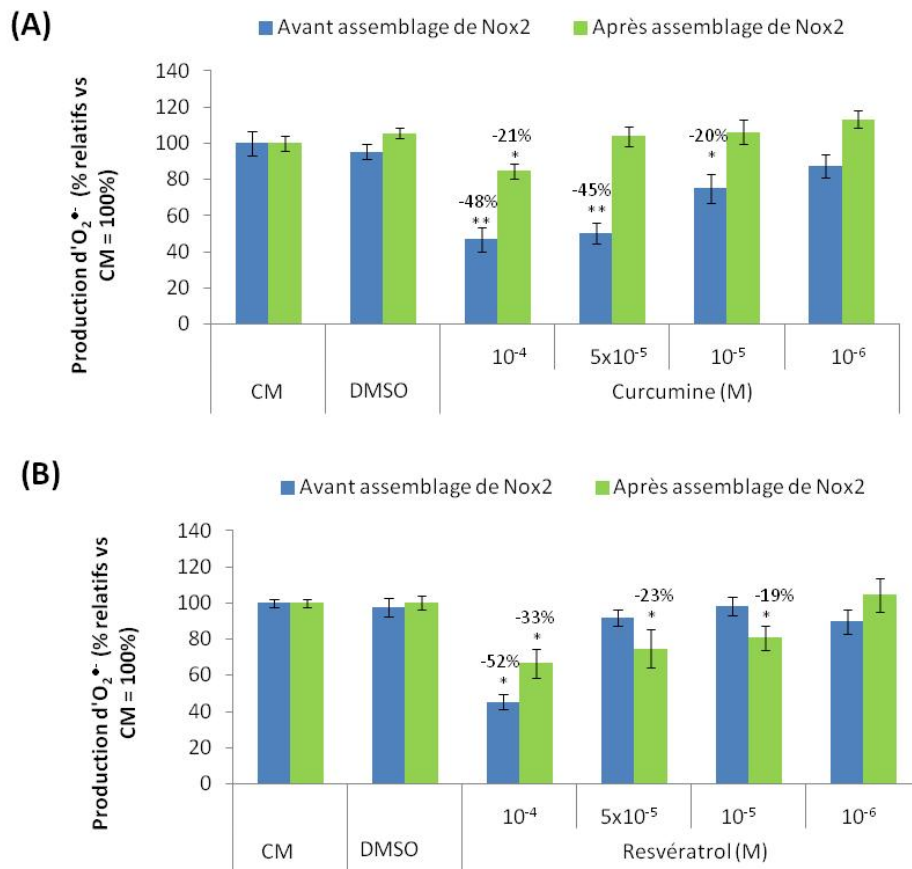


Figure 23. Effet de la curcumine (A) et du resvératrol (B) sur l'assemblage et l'activité de la NADPH oxydase déterminé par la production d' $O_2^{\bullet-}$ en "cell-free system". Les molécules testées sont ajoutées avant (bleu) ou après (vert) l'assemblage de la NADPH oxydase. Les pourcentages d'inhibition indiqués au dessus de chaque colonne sont calculés par rapport aux contrôles DMSO respectifs. ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$. CM: complexe reconstitué sans molécule. Moyenne \pm erreur standard, $n \geq 5$.

Avantages et inconvénients du "cell-free system"

Le développement du "cell-free system" permet de déterminer directement l'effet des molécules sur l'activité et l'assemblage de la NADPH oxydase, ce qui n'était pas possible avec des techniques de CL où l'on mesure la production d' $O_2^{\bullet-}$ par des cellules entières. Avec ces techniques, on ne sait pas déterminer la cible de la molécule : récepteurs membranaires, voie de signalisation, ROS produites ou NADPH oxydase. En plus, le "cell-free system" est une technique rapide qui permet de quantifier la production d' $O_2^{\bullet-}$ car il réagit de façon équimolaire avec le ferricytochrome C [36]. Cependant, le principal inconvénient du "cell-free system" est qu'il ne permet pas d'éliminer la molécule testée du milieu avant la mesure,

ce qui peut entraîner diverses interférences. D'une part, la molécule testée peut réagir avec le ferricytochrome : nous avons observé que des molécules comme la quercétine, un antioxydant polyphénolique, réduit le ferricytochrome, empêchant une détection de l'O₂^{•-} [90]. D'autre part, la molécule peut être un "scavenger" de l'O₂^{•-}, empêchant ce dernier d'être détecté par le ferricytochrome.

L' « EquiNox2 » (voir Article IV p.147)

Principe du dosage

Pour pallier les inconvénients du "cell-free system", nous avons développé une technique originale appelée EquiNox2. Cette technique dérive du "cell-free system" mais comprend une étape de fixation des protéines membranaires ou du complexe enzymatique assemblé *in vitro* sur un support solide.

Dans un premier cas (Figure 24A), les protéines membranaires sont incubées dans les puits d'une microplaque prévue pour la fixation de cellules afin de permettre leur adhésion. L'excès de protéines membranaires et de tampon est éliminé par lavages et les protéines cytosoliques ainsi que les activateurs (arachidonate de sodium et GTP- γ -S) sont ajoutés et incubés sous agitation afin de favoriser l'assemblage du complexe. Les puits sont vidés pour éliminer ce qui ne s'est pas fixé et la révélation est réalisée en ajoutant le co-substrat, le NADPH, et la sonde permettant la détection des O₂^{•-} produits. La sonde utilisée dans ce cas est le L-012, une sonde utilisée en chimiluminescence, car le ferricytochrome C n'est pas assez sensible [36] pour ce type d'expérience. Les valeurs obtenues sont rapportées par mole de cytochrome b₅₅₈ afin de tenir compte des variations d'intensité de signal qui existent entre les différents lots de PMNs isolés.

Dans un deuxième cas (Figure 24B), les protéines cytosoliques, les protéines membranaires et les activateurs sont ajoutés en même temps dans les puits d'une microplaque qui est placée sous agitation pour favoriser l'assemblage du complexe. La plaque est ensuite incubée pour permettre l'adhésion des complexes formés. Après l'incubation, les puits sont vidés et lavés et la révélation est réalisée de la même façon que pour le premier type d'expérience.

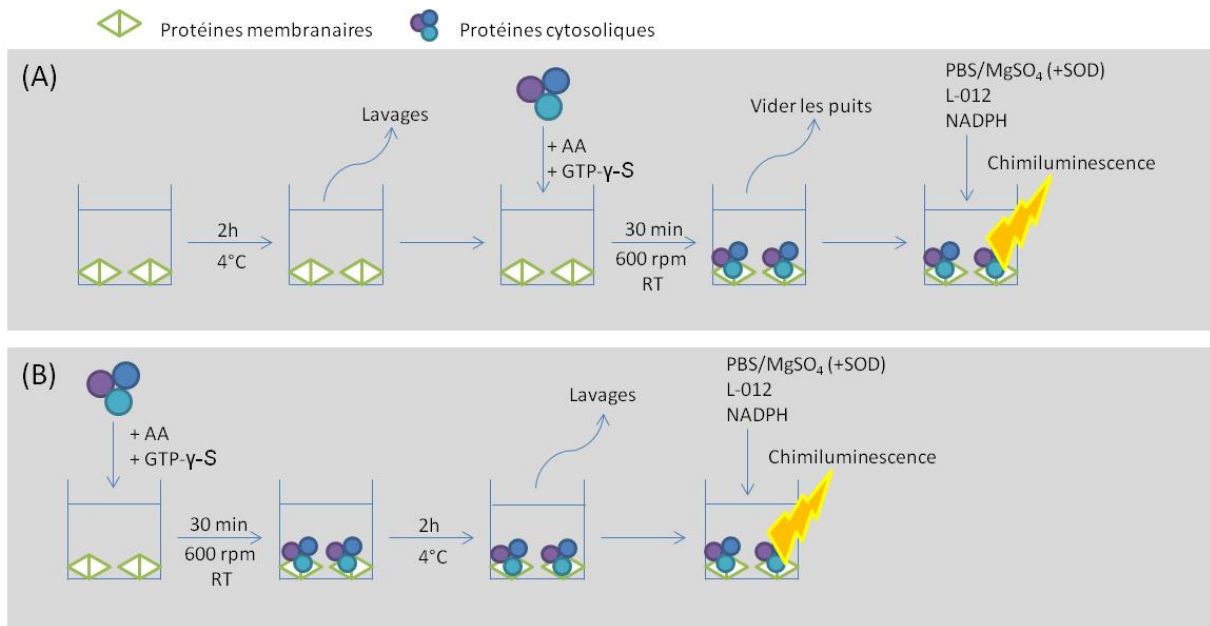


Figure 24. Schéma général de la technique EquiNox2 dans le cas où les protéines membranaires sont fixées dans les puits d'une microplaque (A) et dans le cas où le complexe reconstitué *in vitro* est fixé dans les puits d'une microplaque (B). AA : arachidonate de sodium, RT : "room temperature" ou température ambiante ($\pm 22^{\circ}\text{C}$); PBS/MgSO₄ : tampon de travail PBS + 10 mM MgSO₄. Pour chaque test, un contrôle en présence de SOD est réalisé et le signal est soustrait du signal obtenu sans SOD pour obtenir une mesure spécifique de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Optimalisation du dosage

Tout comme pour le "cell-free system" il a fallu optimiser différents paramètres afin d'obtenir une production maximale d' $\text{O}_2^{\bullet-}$. Ces paramètres comprennent l'étape de fixation des protéines incluant la concentration en protéines, le volume de tampon (PBS+MgSO₄), et la durée et la température de l'incubation permettant une fixation optimale des protéines. Nous avons également déterminé la concentration des agents stimulants et l'influence du nombre de lavages sur l'activité Nox2 mesurée.

Nous avons décidé de garder le même rapport de protéines membranaires et cytosoliques (rapport de 25) qui s'est avéré optimal pour le "cell-free system". L'activité maximale de l'enzyme est obtenue lorsque les quantités de membranes et de protéines cytosoliques sont respectivement de 3,5 μg et 87,5 μg et ce, aussi bien pour la fixation des membranes ou du complexe. Cependant, le signal obtenu est plus intense avec complexe fixé (entre deux et dix fois selon le lot de PMNs) qu'avec les membranes fixées. Nous avons déterminé qu'une incubation de 2h à 4°C dans un volume de tampon de 100 μL était adéquate pour permettre une fixation optimale des membranes ou des complexes obtenir une production maximale d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ [97].

Comme pour le "cell-free system", la concentration optimale en arachidonate de sodium est fortement dépendante de la concentration en sous-unités cytosoliques et membranaires trouvées dans les extraits protéiques non purifiés [88, 95]. Cette concentration doit donc être définie pour chaque lot de PMNs isolés. Nous avons déterminé que, pour un même lot de PMNs, la concentration optimale en arachidonate de sodium pour l'EquiNox2 était double par rapport à celle utilisée en "cell-free system". De même, la concentration en protéines utilisée en EquiNox2 est environ deux fois plus grande par rapport au "cell-free system" (3,5 µg de membranes et 87,5 µg de protéines cytosoliques pour l'EquiNox2 contre 2 µg et 50 µg pour le "cell-free system"). Pour des raisons de facilité, la concentration optimale en arachidonate de sodium a été déterminée pour chaque lot en utilisant le "cell-free system" et une concentration double a été utilisée pour l'EquiNox2. La concentration optimale en GTP-γ-S a été définie à 4 µM pour les deux variantes de l'EquiNox2, ce qui correspond également à une concentration deux fois plus grande par rapport au "cell-free system"[97].

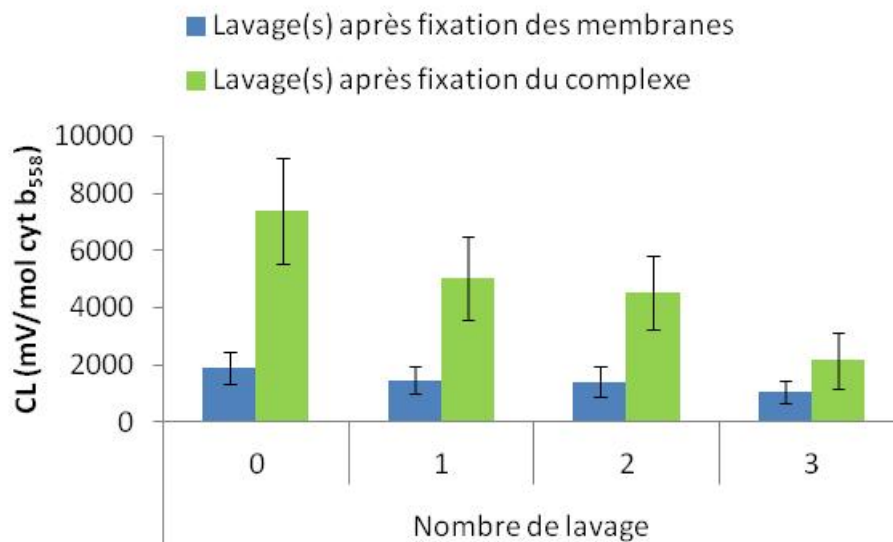


Figure 25. Activité de la NADPH oxydase en fonction du nombre de lavage(s) (0, 1, 2 ou 3) réalisé(s) après la fixation des membranes (bleu) ou du complexe entier (vert). Moyenne ± erreur standard, n≥7.

Nous avons vérifié s'il était possible de réaliser des lavages après la fixation des protéines membranaires ou du complexe entier, afin de pouvoir incuber des inhibiteurs potentiels avec ces protéines et de les éliminer ensuite par lavages pour réduire les interférences mentionnées précédemment pour le "cell-free system" (voir chap. Avantages et

inconvénients du "cell-free system" p.69). La réalisation de un, deux ou trois lavages⁷ n'influence pas significativement l'activité de la Nox2 par rapport à une condition sans lavage (Figure 25). Nous avons donc choisi pour la suite des expériences de réaliser trois lavages.

Validation du dosage

Comme pour le "cell-free system", l'ajout de SOD diminue l'activité de la Nox2 jusqu'à atteindre une phase plateau à partir d'une concentration de 100 U/ml. A partir, et au delà, de cette concentration, la réponse obtenue n'est plus due à la présence d'O₂^{•-}. En réalisant un contrôle avec 200 U/ml de SOD et en soustrayant la valeur obtenue de la valeur sans SOD, nous obtenons une mesure spécifique de l'O₂^{•-}.

Les deux mêmes inhibiteurs employés en "cell-free system" ont été utilisés pour valider le dosage EquiNox2. Le Gp91ds-tat et le DPI ont été incubés avec les membranes ou les complexes fixés et ont été éliminés soit par lavages, soit simplement en vidant les puits⁸, ce qui permet de donner une information sur la force de la liaison qui se crée entre la molécule testée et la membrane ou l'enzyme reconstituée.

Lorsque le DPI est incubé avec les membranes, on observe une inhibition significative de l'activité de la NADPH oxydase, de 10⁻⁴ à 10⁻⁵ M lorsque le DPI est éliminé en vidant les puits, et jusqu'à 5x10⁻⁵ M lorsqu'il est éliminé par lavages avant reconstitution de l'enzyme. Le DPI incubé avec les complexes entiers inhibe l'activité de la Nox2 entre 10⁻⁴ et 10⁻⁵ M après son élimination sans lavage et uniquement à 10⁻⁴ M après son lavage (Figure 26A et B). Nos résultats montrent que le DPI agit sur le complexe reconstitué et sur les membranes, sans empêcher la reconstitution de l'enzyme, confirmant nos résultats obtenus en "cell-free system" et l'effet du DPI décrit dans la littérature [50, 91] (voir chap. Le diphenylène iodonium (DPI) p.44). Le DPI semble aussi se lier aux membranes et aux complexes reconstitués, mais de façon assez labile puisque l'étape de lavage diminue son effet.

Le Gp91ds-tat inhibe l'activité de la Nox2 lorsqu'il est incubé avec les membranes mais pas avec le complexe entier (Figure 26C et D). Son effet inhibiteur est significatif à 50 µM lorsque les puits sont simplement vidés et à partir de 25 µM lorsque la molécule est lavée.

⁷ Ajout d'un volume de tampon (PBS + MgSO₄) suivi de l'élimination de ce tampon.

⁸ Dans ce cas, le lavage est réalisé sur les protéines fixées (membranes ou complexe entier) sur la microplaque avant l'ajout de l'inhibiteur.

L'utilisation de l'EquiNox2 confirme que le Gp91ds-tat interfère avec l'assemblage de la NADPH oxydase et non avec l'activité de l'enzyme reconstituée [51, 92]. De plus, il semblerait que cette molécule interagisse avec les protéines membranaires de Nox2 et que ce soit une liaison forte qui résiste aux lavages. Nous supposons que cette forte liaison entre la molécule et les protéines membranaires accompagnées d'un lavage, affaiblit la liaison des membranes sur le support en plastique pouvant entraîner leur décrochage lors du lavage. Ce qui expliquerait pourquoi le Gp91ds-tat a plus d'effet sur l'activité EquiNox2 lorsqu'il est éliminé et lavé que quand il est simplement éliminé des puits.

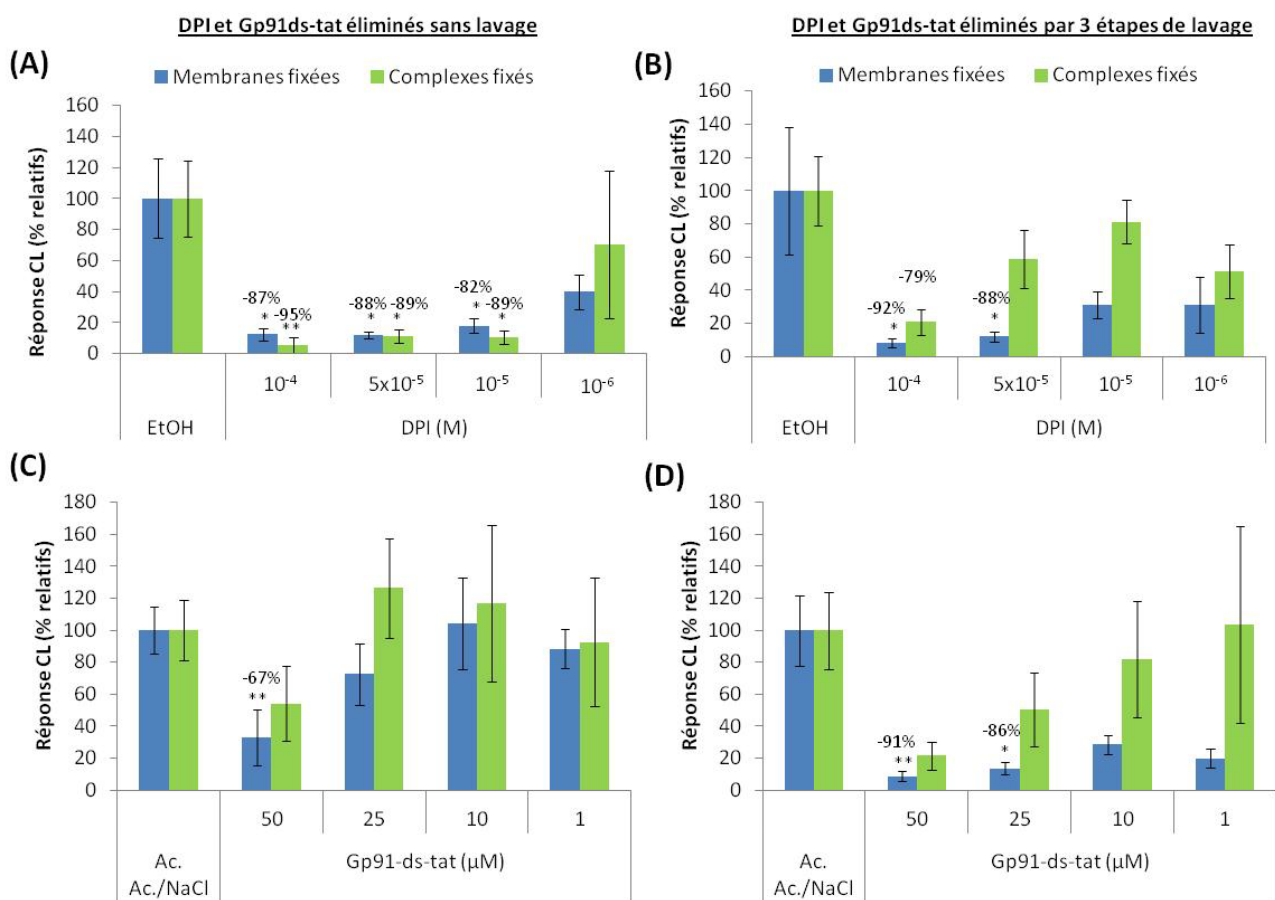


Figure 26. Effet du DPI et du Gp91ds-tat sur l'activité de la NADPH oxydase en EquiNox2. Le DPI (10^{-6} à 10^{-4} M) et le Gp91ds-tat (1 à 50 μ M) sont éliminés en vidant les puits (A, C) ou par lavage (B, D) pour évaluer la force de la liaison entre les molécules et l'enzyme. Le pourcentage d'inhibition indiqué au-dessus de chaque colonne est calculé par rapport au contrôle éthanol (EtOH) pour le DPI et à la solution d'acide acétique/NaCl (Ac.Ac./NaCl) pour le Gp91ds-tat. Les contrôles solvants sont définis comme 100 %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Moyenne \pm erreur standard, $n \geq 6$.

Avantages et inconvénients de l'EquiNox2

L'EquiNox2 est une technique qui permet de déterminer si un inhibiteur présente une liaison forte ou labile avec l'enzyme. Cela est possible grâce à deux étapes importantes de la technique. Premièrement, une étape de fixation des sous-unités membranaires ou du complexe entier sur un support solide, ici le puits d'une microplaque. Deuxièmement, une étape d'élimination de la molécule, avec ou sans lavage, permettant d'avoir une idée sur la force de l'interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur. Grâce à l'étape de lavage, l'EquiNox2 a aussi l'avantage, par rapport au "cell free system", de réduire les interférences entre les molécules testées et la sonde de révélation ou l' $O_2^{\bullet-}$. Les principaux désavantages de la technique sont sa durée plus longue, sa plus grande difficulté à mettre en œuvre et la plus grande consommation en protéines par rapport au "cell-free system".

L'EquiNox2 et le "cell-free system" sont deux techniques complémentaires pour la recherche d'inhibiteurs de la Nox2. Le "cell-free system" est une technique qui peut être utilisée pour un "screening" de molécules d'intérêt, tandis que l'EquiNox2 peut être utilisé pour approfondir les interactions possibles entre des molécules d'intérêt et la NADPH oxydase.

Etude de l'activité du NDS27

Etude de l'activité du NDS27 sur la réponse oxydante des PMNs et des cellules HL-60 (voir Article I p.89)

Les HL-60 sont une lignée continue de cellules promyélocyaires d'origine humaine issues d'un patient souffrant de leucémie promyélocytaire aiguë. Ces cellules peuvent se différencier spontanément en neutrophiles ou en monocytes, mais l'addition d'agents comme le diméthyl sulfoxyde (DMSO) ou l'acide rétinoïque permet d'augmenter cette différenciation [98, 99]. Les HL-60 représentent un modèle d'étude *in vitro* de la réponse oxydante des granulocytes immatures comparées aux neutrophiles, granulocytes matures, spécialisés dans la production de ROS [100].

Effet du NDS27 sur la production de ROS

Deux méthodes ont été utilisées pour mesurer la production de ROS par les cellules. Tout d'abord, nous avons utilisé une technique de CL sensible utilisant la lucigénine comme sonde pour la détection de l' $O_2^{\bullet-}$ produit extracellulairement [36]. Nous avons aussi utilisé une sonde intracellulaire fluorescente, la 2',7'-dichlorofluoresceine-diacétate (DCFH-DA). Cette sonde est désacétylée par des estérases endogènes pour former la 2',7'-dichlorofluoresceine (DCFH) qui est oxydée en 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF) fluorescente. Les espèces pouvant oxyder la DCFH en DCF ne sont pas clairement définies; citons par exemple l' H_2O_2 , le NO^{\bullet} , le $ONOO^-$, le OH^{\bullet} ou l' $O_2^{\bullet-}$ [101, 102].

Le NDS27 a été testé dans deux conditions différentes avec ces méthodes. Nous avons, d'une part, pré-incubé les cellules avec la molécule qui a ensuite été éliminée avant l'activation des cellules et la mesure de la production de ROS. Cela permet d'évaluer un effet intracellulaire et/ou membranaire de la molécule. D'autre part, nous avons laissé le NDS27 dans le milieu pendant l'activation des cellules et la mesure des ROS produites, permettant essentiellement d'évaluer l'effet extracellulaire ou "scavenger" du NDS27. Notre étude en CL a montré que le NDS27 pré-incubé avec les PMNs, inhibait la production d' $O_2^{\bullet-}$ à partir de 10^{-5} M. Une telle observation n'a pu être réalisée avec les HL-60 possédant peu de NADPH oxydase et produisant de faibles quantités d' $O_2^{\bullet-}$ [103, 104]. L'étude en fluorescence a montré que 10^{-5} M de NDS27 pré-incubé avec les cellules inhibe la production globale de ROS par les HL-60 et les PMNs avec une efficacité accrue sur ces dernières. Ces effets

inhibiteurs sont encore plus importants et se manifestent à partir de 10^{-6} M lorsque le NDS27 est laissé dans le milieu, montrant que cette molécule présente aussi bien des effets cellulaires (au niveau du cytosol ou de la membrane) qu'extracellulaires. L'HP β CD seul, l'excipient du NDS27, diminue uniquement la production de ROS par les HL-60 et les PMNs, lorsqu'il est laissé dans le milieu pendant la mesure [105].

Capacité de la curcumine du NDS27 à entrer dans les cellules

Par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), nous avons déterminé que la curcumine était capable d'entrer dans les cellules. Après la lyse des cellules et la séparation en différentes fractions, la curcumine se retrouve principalement au niveau des débris cellulaires (cellules non lysées, granules et noyaux) et, ensuite, au niveau des membranes et du cytosol (Figure 32). Nous avons montré que le pourcentage de curcumine intracellulaire retrouvé au niveau des HL-60 (89 %) était plus important que pour les PMNs (65 %) [105], sans doute dû à la différence de la composition membranaire des HL-60 (concentration en lipides, cholestérol et protéines) [106-108].

Effet du NDS27 sur la libération et l'activité de la MPO

Puisque la curcumine du NDS27 est capable d'entrer dans les cellules, nous nous sommes intéressés à l'effet de cette molécule sur l'activité d'une enzyme du neutrophile responsable de la production de ROS : la MPO. Avec les méthodes ELISA [109] ("Enzyme-linked immunosorbent assay") et SIEFED [56] (voir chap. Mesure de l'activité de la MPO en "SIEFED" p.51), nous avons déterminé que le NDS27 n'avait pas d'influence sur la quantité totale de MPO libérée suite à la stimulation des cellules mais qu'à partir de 5×10^{-5} M, il réduisait l'activité de la MPO libérée, et ce de façon similaire pour les HL-60 et les PMNs [105]. Nous avons également testé l'effet du NDS27 sur de la MPO humaine purifiée en SIEFED pharmacologique [110] qui permet de mettre en évidence des interactions entre des inhibiteurs potentiels et la MPO. Avec cette méthode, nous avons montré que la molécule interagit avec l'enzyme et inhibe significativement son activité à partir de 10^{-5} M (Figure 27).

Le HP β CD⁹ seul ne présente pas d'effet sur l'activité de la MPO libérée [105] mais aux plus fortes concentrations utilisées (5×10^{-4} et 25×10^{-5} M), il inhibe l'activité de la MPO humaine purifiée.

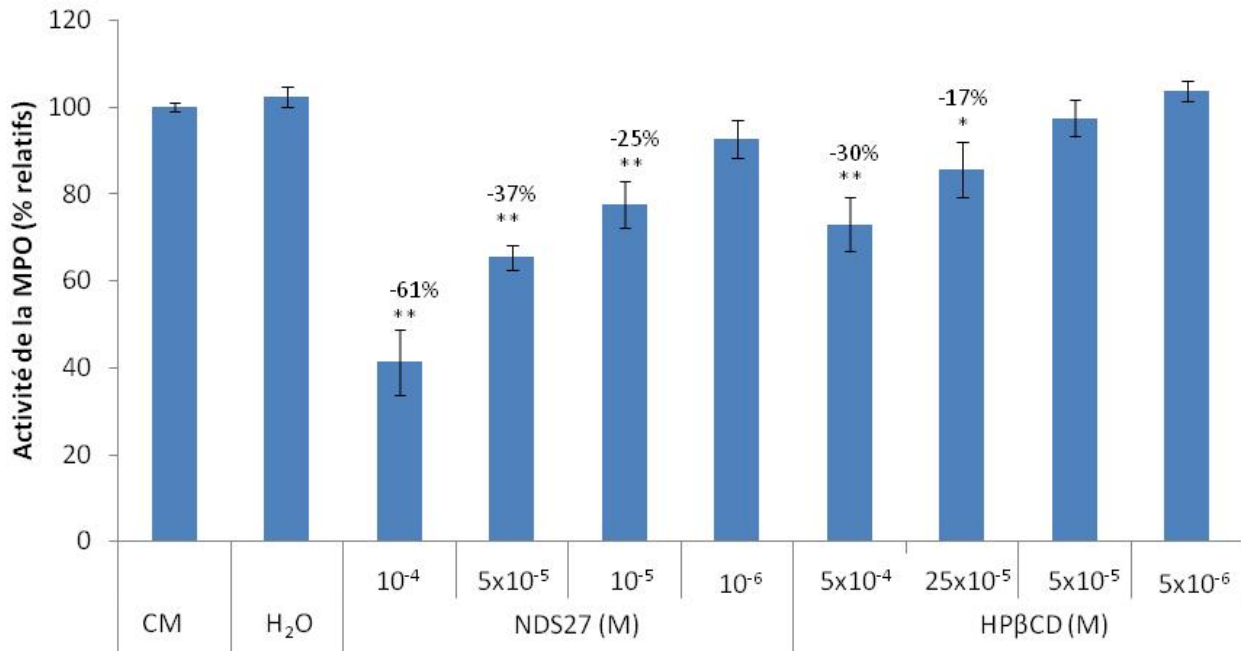


Figure 27. Effet du NDS27 et de l'HP β CD sur l'activité de la MPO humaine purifiée en SIEFED pharmacologique. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Moyenne \pm SEM, $n \geq 5$.

Conclusions

Il ressort de cette étude [105] que : (1) le NDS27 agit sur la production intra- et extracellulaire de ROS; (2) le NDS27 semble plus efficace pour inhiber les ROS produites par les PMNs, cellules spécialisées la production de ROS; (3) la curcumine du NDS27 entre plus facilement dans les HL-60 que les neutrophiles; (4) le NDS27 inhibe l'activité de la MPO et (5) les effets du NDS27 ne sont pas dû à sa cyclodextrine (HP β CD) qui présente peu d'effet à elle seule.

⁹ Les concentrations en NDS27 sont exprimées en termes de concentration en curcumine. La concentration en cyclodextrine dans le NDS27 est cinq fois supérieure à la concentration en curcumine. Ainsi, pour comparer le NDS27 et l'HP β CD, il faut donc que la concentration en HP β CD soit cinq fois supérieure à celle en NDS27.

Etude de l'activité du NDS27 sur deux enzymes impliquées dans la production de ROS par les PMNs : la NADPH oxydase et la PKC (voir Article III p.125)

L'étude précédente a montré que le NDS27 était non seulement capable de réagir avec les ROS produites (effet "scavenger") mais aussi d'entrer dans les cellules et d'interagir avec des acteurs impliqués dans leur production, notamment la MPO. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du NDS27 sur l'activité de la NADPH oxydase et de la PKC impliquée dans l'activation de cette enzyme (voir chap. Activation de la NADPH oxydase p.38). En effet, l'action de la curcumine sur l'activité de la PKC est bien décrite [76, 111, 112] alors que son effet sur la NADPH oxydase est peu connu.

Effet du NDS27 sur la PKC δ

La PKC δ est un isotype de la PKC impliqué dans l'activation de la NADPH oxydase suite à la stimulation des neutrophiles avec le fMLP [12]. L'effet du NDS27 sur l'activation de la PKC, c'est-à-dire la translocation de la PKC phosphorylée du cytosol vers la membrane, a été déterminé par Western blot avec des anticorps reconnaissant la PKC δ phosphorylée (p-PKC δ). Les PMNs ont été incubés avec le NDS27 ou l'HP β CD seule, puis lysés, et les protéines membranaires et cytosoliques ont été séparées par ultracentrifugation. La p-PKC δ a ensuite été marquée dans les extraits cytosoliques et membranaires et, pour évaluer la migration de l'enzyme vers la membrane, la densité des marquages a été mesurée et les rapports membrane/cytosol ont été calculés (Figure 30). Par rapport au contrôle (cellules sans NDS27 ni HP β CD), le NDS27 diminue la translocation de la PKC vers la membrane (-50 %) et l'HP β CD seule a un effet encore plus prononcé (-71 %). Les molécules ont été testées sur l'activité de la PKC δ , dans un système acellulaire mesurant la capacité de l'enzyme recombinante à incorporer des groupements phosphates sur un substrat, par une technique radiométrique (réalisation par la société proKinase). Nous avons montré que le NDS27 réduit l'activité de la PKC δ ($IC_{50} = 1,67 \times 10^{-5}$ M) mais que l'HP β CD n'a aucun effet [113].

Effet du NDS27 sur l'assemblage et l'activité de la NADPH oxydase

En "cell-free system", nous avons montré que le NDS27 (à partir de 10^{-5} M) inhibe l'activité de la NADPH oxydase principalement lorsqu'il est ajouté avant l'assemblage de l'enzyme (Figure 28). Il semblerait que ce complexe agisse en empêchant l'assemblage et donc l'activation de Nox2. Mais nous avons observé les mêmes effets (à partir de 5×10^{-5} M), avec

des pourcentages d'inhibition plus importants lorsque l'HP β CD est testée seule. Il semblerait donc que la cyclodextrine joue un rôle important dans l'activité du NDS27 dont l'effet est dû à la combinaison de l'HP β CD avec le lysinate de curcumine, car nous avons montré que la curcumine seule agissait également sur l'assemblage de la Nox2 (Figure 23A) mais avec une efficacité moindre que le NDS27.

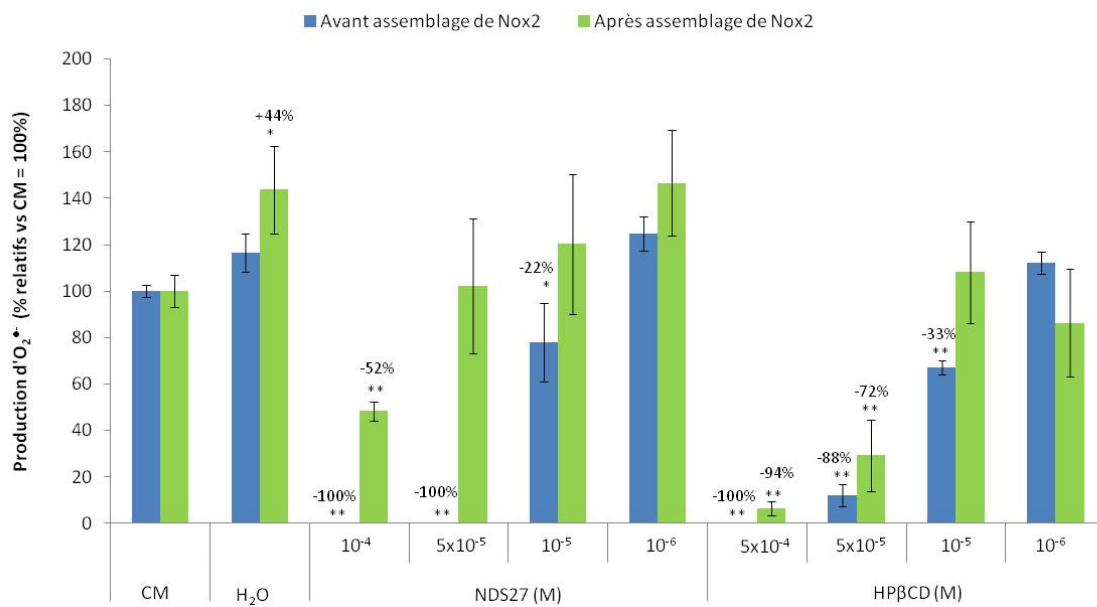


Figure 28. Effet du NDS27 et de l'HP β CD sur l'activité et l'assemblage de la NADPH oxydase déterminé par la production d'O₂^{•-} en "cell-free system". Les molécules testées sont ajoutées avant (bleu) ou après (vert) l'assemblage de l'enzyme. Les pourcentages d'inhibition indiqués au dessus de chaque colonne sont calculés par rapport au groupe contrôle (CM) défini comme 100 %. **p<0,001, *p<0,05. CM : complexe reconstitué sans addition de molécule. Moyenne \pm erreur standard, n \geq 6.

Puisque l'HP β CD semble jouer un rôle important dans l'inhibition de la translocation de la PKC δ vers la membrane et l'activation de Nox2, nous avons voulu déterminer l'implication de cette cyclodextrine dans l'activité du complexe. Notre équipe a donc synthétisé un autre complexe, le NDS28, dans lequel l'HP β CD a été remplacé par la γ -cyclodextrine ou γ -CD (Figure 29). Une étude similaire à celle menée sur le NDS27 a été réalisée avec le NDS28 et son efficacité sur la réponse oxydante des neutrophiles, la libération et l'activité de la MPO et les activités de la NADPH oxydase et de la PKC δ a été déterminée.

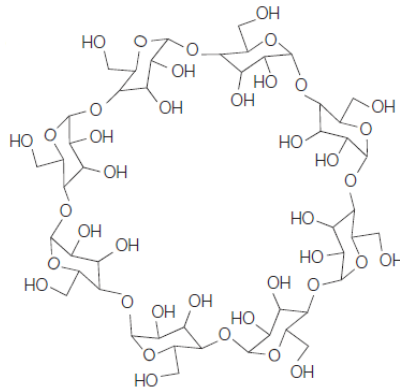


Figure 29. Structure chimique de la γ -cyclodextrine [82].

Comparaison du NDS27 et du NDS28 sur la réponse oxydante des PMNs et des HL-60 et sur les activités de la MPO, de la NADPH oxydase et de la PKC des PMNs

L'étude du NDS28 sur l'activité oxydante des neutrophiles et des HL-60 a donné des résultats similaires à ceux obtenus avec le NDS27 [114]. Nous avons montré que le NDS28 : (1) inhibe la production d' $O_2^{\bullet-}$ par les PMNs, (2) inhibe la production de ROS par les PMNs et les HL-60, (3) n'agit pas sur la quantité de MPO libérée par les cellules mais réduit l'activité de la MPO libérée et (5) se lie à la MPO pour interagir avec son activité. La γ -CD seule a présenté peu d'effet dans ces modèles.

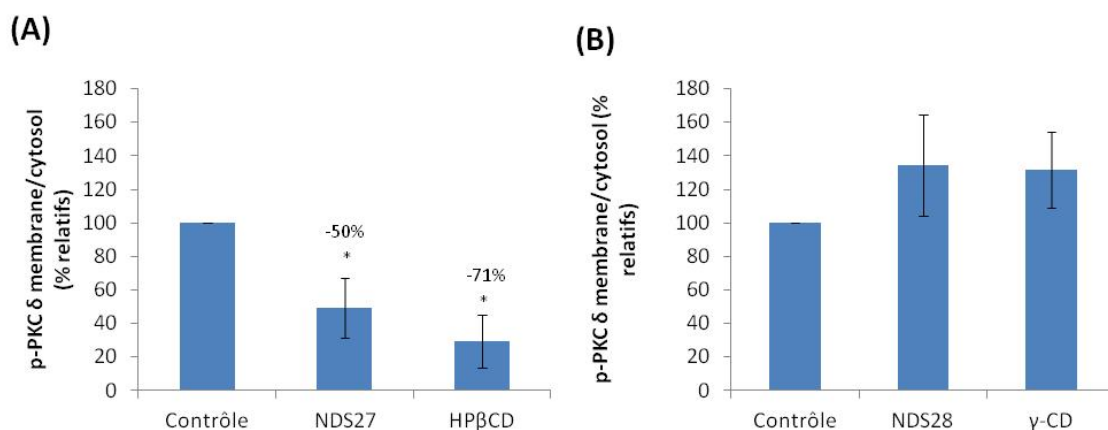


Figure 30. Quantification (ImageJ software) de la p-PKC δ détectée par western blot dans des extraits cytosoliques et membranaires de PMNs incubés ou non avec du NDS27 ou du NDS28, de l'HP β CD ou de la γ -CD. Les résultats sont exprimés en rapport de p-PKC δ détectée dans les membranes et dans les extraits cytosoliques. Les pourcentages d'inhibition indiqués au dessus de chaque colonne sont calculés par rapport aux cellules contrôles (contrôle déterminé comme 100 %). * $p < 0,05$. (Moyenne \pm erreur standard, $n \geq 4$).

Nous avons montré en western blot que le NDS28 et sa γ -CD n'influencent pas la translocation de la PKC δ (Figure 30). Par contre, en modèle acellulaire, le NDS28 inhibe l'activité de la PKC avec un IC₅₀ de $1,26 \times 10^{-5}$ M proche de celui du NDS27 et la γ -CD n'a pas d'effet. En "cell-free system", ni le NDS28 ni la γ -CD n'ont d'effet sur l'activité Nox2, que ces molécules soient ajoutées avant ou après l'assemblage de l'enzyme.

Nos résultats indiquent donc que la modification de la cyclodextrine change le comportement du NDS28 par rapport au NDS27 sur la translocation de la PKC et l'assemblage de la NADPH oxydase. Les β -CD et γ -CD diffèrent par la taille de leur cavité qui est formée respectivement par sept et huit unités de glucose [82]. Parmi ces cyclodextrines, les β -CD sont reconnues comme étant de meilleurs accepteurs de stérol grâce à la taille de leur cavité qui est compatible avec celle du cholestérol [84]. D'après ces informations, nous nous sommes posé deux questions :

- Le NDS27 et le NDS28 sont-ils capables d'influencer sur le contenu lipidique des membranes plasmiques lorsqu'ils sont mis en contact avec des cellules ?
- Si ces molécules sont capables d'extraire des lipides, sont-elles également capables de libérer le lysinate de curcumine inclus dans les cyclodextrines ?

Capacité du NDS27 et NDS28 à extraire les lipides membranaires

Pour répondre aux questions précédentes, nous avons utilisé deux méthodes afin de déterminer l'effet des molécules sur le contenu lipidique des cellules. La première technique est une coloration des lipides de la membrane plasmique des PMNs à l'"Oil Red O" suivie d'une mesure d'absorbance de ces cellules. La sensibilité limitée de la technique nous a contraint à travailler avec de fortes concentrations en produits. Par cette technique, nous avons montré que l'absorbance mesurée sur les suspensions cellulaires était moindre lorsque les cellules ont été pré-incubées avec le NDS27 ou l'HP β CD (à partir de 2×10^{-3} et 10×10^{-3} M respectivement). Ces résultats suggèrent une diminution de la concentration en lipides dans les cellules mises en contact avec ces molécules. Par contre, l'incubation des cellules avec le NDS28 ou la γ -CD n'a pas influencé le contenu lipidique des cellules.

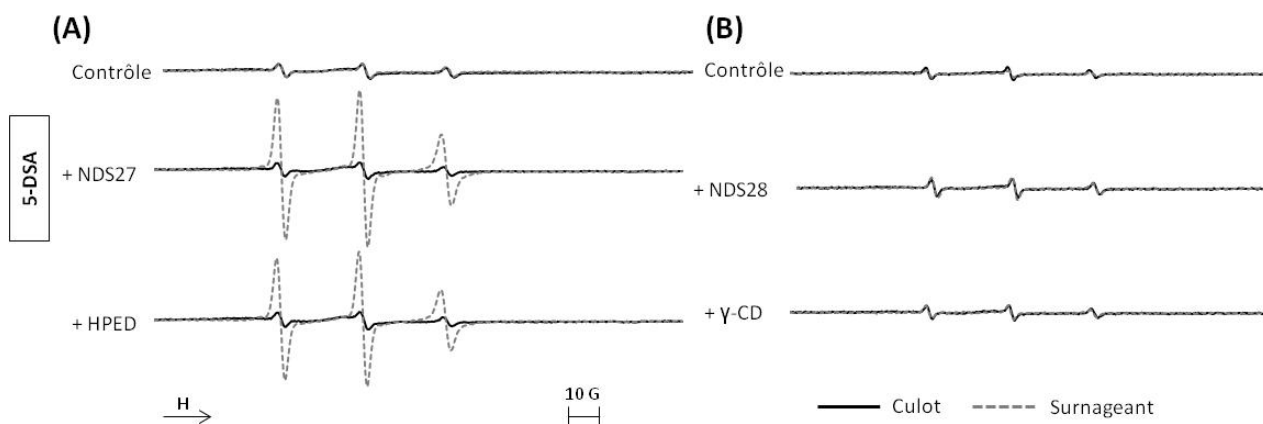


Figure 31. Exemple de spectres obtenus en EPR avec 5×10^6 HL-60 incubées avec la 5-DSA et traitées avec 10^{-4} M de NDS27 (A) ou de NDS28 (B) et 5×10^{-4} M d'HPβCD (A) ou de γ-CD. Après la centrifugation des cellules, les spectres EPR ont été enregistrés sur le surnageant (lignes en pointillés) ou sur les culots cellulaires reconstitués dans l'HBSS (lignes en trait plein). Le contrôle comprend des HL-60 non incubées avec du NDS27 ou de l'HPβCD. Des résultats reproductibles ont été obtenus sur au moins trois expériences.

Nous avons confirmé ces résultats par une technique EPR (résonance paramagnétique électronique), beaucoup plus sensible, en utilisant les sondes 5- et 16-DSA (acide 5-doxy-stéarique et l'acide 16-doxy-stéarique) qui sont hydrophobes et ont tendance à s'ancrer plus ou moins profondément dans la membrane plasmique des cellules incubées avec celles-ci. Ces sondes possèdent un radical nitroxyde avec un électron célibataire centré sur l'azote, situé au niveau du 5^{ème} ou 16^{ème} carbone respectivement, et présentent des signaux EPR caractéristiques différents selon qu'elles sont libres ou ancrées dans la membrane [115]. Après leur incorporation dans la membrane des HL-60¹⁰, nous avons éliminé l'excès des sondes par centrifugation et incubé les cellules avec les molécules testées (NDS27, NDS28, HPβCD et γ-CD). Les spectres EPR ont été réalisés séparément sur le culot cellulaire remis en suspension et sur le surnageant. Grâce à ces expériences, nous avons montré que l'incubation des cellules avec le NDS27 et, dans une moindre mesure, avec l'HPβCD provoque une augmentation de l'intensité du signal caractéristique des sondes libres dans le surnageant (Figure 31A). Ces résultats suggèrent que le NDS27 et l'HPβCD extraient les

¹⁰ Par simplicité les expériences EPR ont été réalisées en triplicat avec des cellules HL-60 qui sont plus facilement obtenues par rapport au PMNs isolés. Des résultats similaires ont été obtenus avec des PMNs équins isolés.

sondes fixées dans les membranes après l'incubation et les libèrent dans le tampon. L'effet est plus marqué avec la 5-DSA qui entre moins en profondeur dans la membrane et qui est donc plus facilement extraite lors de l'incubation avec le NDS27 ou l'HP β CD. Le NDS28 et la γ -CD ont montré très peu d'effet avec cette technique (Figure 31B) tout comme dans les expériences de coloration à l'"Oil Red O". La différence d'effet entre le NDS27 et NDS28 réside donc dans le type de cyclodextrine utilisée et leur capacité à extraire ou non des lipides de la membrane plasmique [113].

Capacité de la curcumine du NDS27 et NDS28 à entrer dans les PMNs

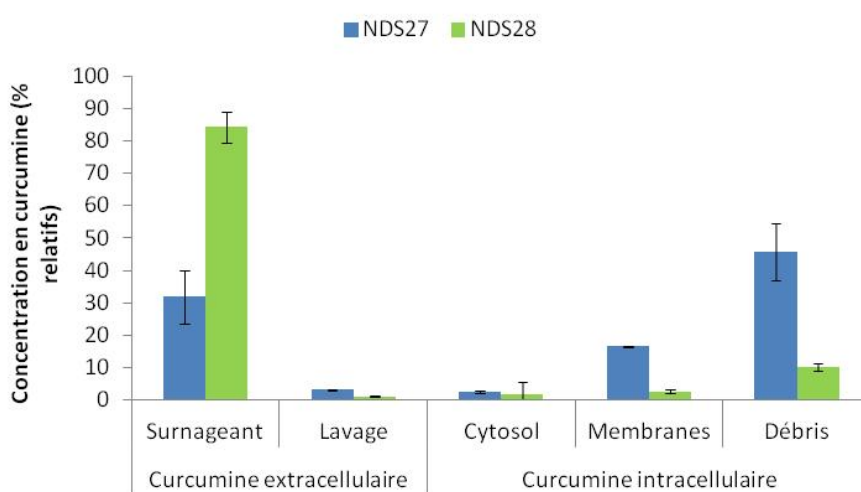


Figure 32. Quantification de la curcumine provenant du NDS27 et du NDS28 (10^{-4} M) qui entre ou non dans les PMNs après une incubation. Surnageant : curcumine présente dans le surnageant après 30 minutes d'incubation avec les cellules. Lavage : curcumine présente dans le tampon de lavage après deux étapes de lavage des cellules. Cytosol et membranes : curcumine présente dans les fractions cytosoliques et membranaires après l'ultracentrifugation des cellules lysées. Débris : curcumine présente dans les granules, les cellules non lysées et les noyaux. Les données sont exprimées en pourcentages relatifs calculés par rapport à la somme des quantités de curcumine retrouvées dans les différentes fractions et déterminée comme 100 %. Moyenne \pm erreur standard, $n \geq 2$.

Les résultats obtenus avec l'"Oil Red O" et les sondes en EPR semblent aller dans le même sens et montrer que le NDS27 et sa cyclodextrine sont capables d'extraire des lipides et sans doute du cholestérol hors des membranes, alors que le NDS28 et la γ -CD ne le font pas. Pour savoir si cette extraction s'accompagne de la libération du lysinate de curcumine présent dans les cyclodextrines, nous avons réalisé un dosage de la curcumine dans différentes fractions cellulaires (cytosol, membranes et débris cellulaires) après une incubation des PMNs avec le NDS27 ou NDS28. Nous avons déjà montré que la curcumine du NDS27 était capable d'entrer dans les cellules. Par contre, la curcumine du NDS28 se retrouve

essentiellement dans le surnageant cellulaire après incubation avec des PMNs (85 %), montrant que le NDS28 ne favorise pas l'entrée de la curcumine dans les membranes ou les cellules par rapport au NDS27 (Figure 32).

Interaction entre le NDS27 et Nox2

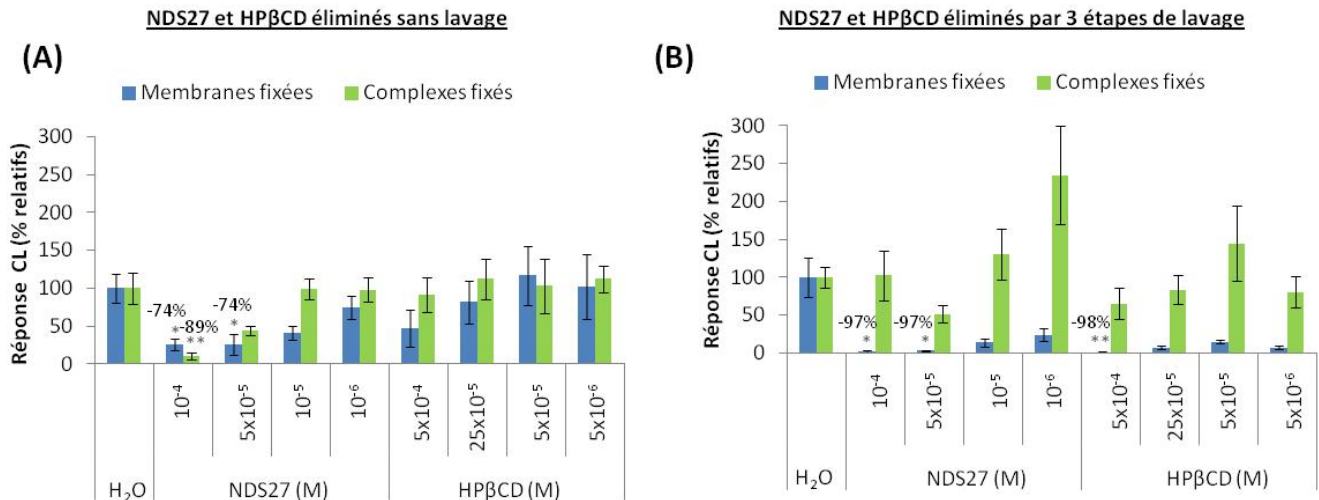


Figure 33. Effet du NDS27 et de l'HPβCD sur l'activité de la NADPH oxydase en EquiNox2. Le NDS27 (10^{-6} à 10^{-4} M) ou l'HPβCD (5×10^{-6} à 5×10^{-4} M) sont éliminés en vidant les puits (A) ou par lavages (B) pour évaluer la force de liaison entre la molécule et l'enzyme. Le pourcentage d'inhibition indiqué au dessus de chaque colonne est calculé par rapport au contrôle H₂O défini comme 100 %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. Moyenne \pm erreur standard, $n \geq 5$.

Nous avons montré que le lysinate de curcumine était libéré par le NDS27 et qu'une partie était intégrée dans les membranes du neutrophile où il peut inhiber l'activité de protéines membranaires [78, 116]. Nous avons également montré que le NDS27 était capable d'inhiber l'assemblage de la NADPH oxydase, mais agit-il en se fixant aux sous-unités de l'enzyme ? Grâce à l'EquiNox2, nous avons montré que le NDS27 a essentiellement un effet lorsqu'il est incubé avec les protéines membranaires fixées sur le support plutôt qu'avec le complexe entier reconstitué, ce qui prouve une interaction directe du NDS27 avec les sous-unités membranaires de l'enzyme. Le NDS27 présente une inhibition plus importante de l'activité EquiNox2 lorsqu'il est éliminé et lavé avant la mesure de l'activité enzymatique que lorsqu'il est simplement éliminé avant la mesure de l'activité enzymatique (Figure 33). Cela démontre une forte interaction entre le NDS27 et les sous unités membranaires de l'enzyme. Comme pour le Gp91ds-tat (voir chap. Validation du dosage EquiNox2 p.73) cette forte interaction accompagnée de lavages favorise sans doute le décrochage des protéines.

Conclusions

Nous avons montré que l'effet du NDS27 était dû à une combinaison de l'action de l'HP β CD et du lysinate de curcumine. Ces molécules favorisent un mécanisme d'échange du lysinate de curcumine contre des lipides et du cholestérol des membranes plasmiques. La curcumine libérée s'intègre dans les membranes où elle peut agir sur l'activité de protéines membranaires et interagir avec les sous-unités membranaires de la NADPH oxydase. Le NDS27 est aussi responsable d'une altération de la distribution des lipides, pouvant expliquer ses effets sur l'assemblage de la Nox2 et sur la translocation de la PKC phosphorylée vers la membrane. Mises en présence avec le NDS27, les membranes plasmiques s'appauvrissent en lipides et en cholestérol qui est remplacé par le lysinate de curcumine. Cette modification peut influencer la transduction du signal via l'altération des radeaux lipidiques ou "lipid raft", microstructures membranaires riches en cholestérol, qui interviennent dans l'activation de la PKC et de la NADPH oxydase [117, 118]. Le choix de la cyclodextrine est donc important pour conserver et accentuer l'effet du lysinate de curcumine sur l'activation et l'activité de la NADPH oxydase.

Présentation systématique des résultats

Article I

Intra- and extracellular antioxidant capacities of the new water-soluble form of curcumin (NDS27) on stimulated neutrophils and HL-60 cells

Sandrine Derochette, Thierry Franck, Ange Mouithys-Mickalad, Ginette Deby-Dupont, Philippe Neven, Didier Serteyn

Chemico-Biological Interactions 201 (2013) 49-57

Abstract

Phagocytic cells, especially neutrophils (PMNs) are specialized in the production of reactive oxygen species (ROS) to kill pathogenic agents, but an excessive ROS production is associated with tissue damages and inflammatory diseases. Phagocytes are thus prime therapeutic targets to control inflammatory events associated to ROS production. Nowadays, there is a growing interest for the use of polyphenols to modulate the inflammatory response. The aim of this work was to study the antioxidant effect of NDS27, a highly water-soluble form of the polyphenolic molecule curcumin, on *in vitro* stimulated equine PMNs and human promyelocytic leukemia cells (HL-60). NDS27 was either pre-incubated with cells and eliminated before their activation (intracellular effect) or let in the medium (extracellular effect). Our results indicate that NDS27 significantly and dose-dependently (10^{-6} M to 10^{-4} M) inhibited the ROS production in both cell types without affecting their viability. NDS27 was able to cross and interact with cell membrane, especially for HL-60 cells, while we observed a better intracellular antioxidant effect with PMNs. The activity of myeloperoxidase (MPO) released by PMNs and HL-60 cells, was decreased by NDS27, but more efficiently for PMNs. These results suggested that the greater efficiency of NDS27 in PMNs is due to an inhibitory effect on cells which are more mature for ROS production, probably by targeting the enzymes implied in respiratory burst like MPO. The modulatory effect of NDS27 on the oxidant activity of cells involved in immune and inflammatory responses opens perspectives for a therapeutic control of pathologies with excessive inflammatory reactions.

Introduction

Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) have an essential function of innate immune defence against infectious diseases [10]. The main function of PMNs is to destroy microbial agents within the neutrophil granules by using protease, lactoferrin, lysozyme, etc. but also by producing reactive oxygen species (ROS) with subsequent increase of the oxygen consumption called “respiratory burst” [23, 119]. In PMNs, the ROS production starts with superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) formation arising from the activation of NADPH oxidase [33, 119] which reduces molecular oxygen (O_2) [119]. If the moderate production of ROS can have beneficial effects on the redox homeostasis [120], excessive production of ROS, known as oxidative stress, is associated with tissue damages and contributes to the induction of chronic or acute inflammatory diseases [25, 28, 120]. The HL-60 cell line is derived from a patient with acute promyelocytic leukemia. These cells are predominantly promyelocytes, but in most cell cultures a few part exhibits a spontaneous differentiation into mature cells including monocytes and neutrophils [99]. The addition of agents such as DMSO or retinoic acid to the cell culture increases this spontaneous differentiation [98, 99]. These cells provide an *in vitro* model for studying oxidative response in immature cells compared to neutrophils which are specialized in ROS production [100]. Several studies showed that the inhibition of the oxidant response of neutrophils becomes a therapeutic challenge to control or modulate an excessive inflammatory response. Beside both steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), there is an increasing interest to find naturally occurring agents with very few side effects for therapeutic substitution [81, 121].

Curcumin is a natural phenolic compound responsible for the yellow colour of turmeric (*Curcuma longa*) and is widely used as a food colorant and flavouring [2, 31]. It has numerous properties such as antioxidant [31, 75, 122, 123], anti-carcinogenic [75, 77, 122], anti-inflammatory [77, 122, 123], anti-thrombotic [122], anti-infectious activities [75, 122] and cardiovascular protective effect [122]. The therapeutic interest for using curcumin is related to its low toxicity and large biological activities [75, 124]. It targets numerous biological molecules and interacts with transcription factors, cytokines and enzymes [76, 122]. It is involved in the inhibition of oxidative response induced by activated PMNs through either ROS scavenging [75, 111] or inhibiting the ROS generation [75], but also by interfering with the myeloperoxidase (MPO) activity [2], an enzyme found in high concentration in

PMNs and especially active which contributes to amplify their ROS production. In addition, it has also been reported that curcumin inhibits the leukocyte activation including PMNs [125] and monocytes [126]. As the insolubility of curcumin in aqueous milieu complicates its use in biochemical assays, a modified highly water-soluble salt of curcuminoid derivative called NDS27 (Figure 34) conjugate with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD used to make curcumin water soluble) (Figure 34) has been developed [81]. Its efficiency has been recently demonstrated *in vivo* on recurrent airway obstruction in horses as NDS27 was able to reduce PMNs influx in respiratory airway and lowered the MPO concentration in bronchoalveolar lavage [4].

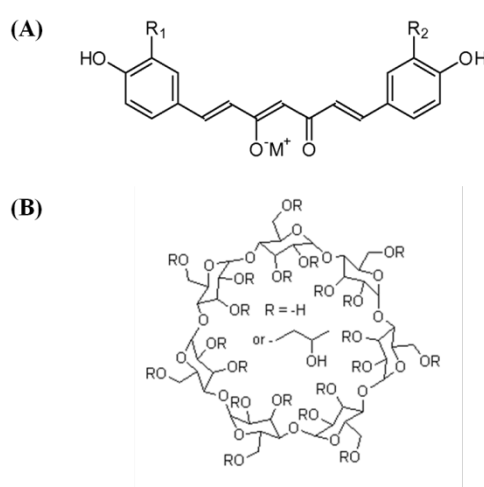


Figure 34. NDS27 is a combination of a salt of curcuminoid derivative (A) with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP β CD) (B). M is lysine or arginine and R1 and R2 are each independently selected from hydrogen, hydroxy or alkoxy, and/or stereoisomers [34].

The aim of this work was to study the antioxidant effect of NDS27 on the ROS production, total MPO and active MPO release by isolated equine neutrophils and to compare its effect with human promyelocytic leukemia cells (HL-60). HL-60 cells and PMNs were activated either with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) [3], which crosses the membrane and activates PKC inducing NADPH oxidase activation [33] ; or with a combination of cytochalasine B (CB), a cytoskeleton-disrupting compound, and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), a tripeptide acting via G-protein receptor involved in the activation cascade of NADPH oxidase [3]. We completed our investigations by studying the capacity of NDS27 to enter into the cells and thus its capacity to play an intracellular role. These different types of experiments will help to understand the intra- and extracellular effect of NDS27 *per se* on ROS production.

Material and methods

Chemicals and reagents

Analytical grade Na and K salts [Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)], hydrochloric acid (HCl), dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) were from Merck and 24-well plates (Nunclon Δ surface) from Nunc (VWRI, Leuven, Belgium). Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), percoll, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), cytochalasin B, lucigenin, and N-formyl-methionyl-leucyl-alanine (fMLP) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) was purchased from Eastman Kodak (Rochester, NY). Trypan blue was from ICN Biomedicals, Inc (Ohio, USA) and horseradish peroxidase (HRP) was obtained from Roche (Mannheim, Germany). IMDM medium, penicillin, streptomycin, amphotericin B, fetal bovine serum and Hanks' balanced salt solution (HBSS) were from Gibco-Invitrogen (Fischer Scientific, Erembodegem, Belgium). NDS27 was a gift from Philippe Neven (Faculty of Pharmacy, University of Liège, Belgium).

Methods

Cell culture

Human promyelocytic leukemia cells (HL-60) were obtained from the American Type Culture Collection (ACCT, USA) and cultured in IMDM medium supplemented with 20 % (v/v) fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin/streptomycin, 1.25 mg/ml amphotericin B, and 2 g/l NaHCO_3 in 50 ml flasks at 37 °C in a 5 % CO_2 humidified atmosphere. Cells were fed (culture medium change) from two to three times per week to maintain log phase growth. Once a week, the contents of culture flasks were centrifuged and the cell pellets re-suspended in fresh IMDM and divided among new culture flasks. Before each experiment, cells were counted with Burker' cell (Briare, France) to reach the cell number required for the experiments, generally 10^6 cells/ml (unless particular indication in the text).

Isolation of equine neutrophils

Neutrophils were isolated from blood drawn on EDTA tubes from the jugular vein of healthy horses, fed and bred in identical conditions and not under medical treatment (Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium). Each batch of neutrophils was obtained from 60 ml blood drawn from one horse; the cells were used immediately after isolation, the

experiment was completed within 5 h and each assay was performed in triplicate. Each experiment was repeated twice with different cell batches from different horses. The neutrophils were isolated at room temperature (18-22°C) by centrifugation (400g, 30 min at 20 °C) on a discontinuous percoll density gradient according to the method of Pycock *et al.* (1987) [127]. The polymorphonuclear fraction was gently collected and washed in two volumes of physiological saline solution. The cell pellets were suspended in 20 mM phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.4 containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl. The cell preparation was ≥ 90 % neutrophils with a viability of 95 % as measured by the Trypan blue exclusion test [128].

Effect of NDS27 and HP β CD on PMNs and HL-60 viability

Unstimulated cells (10^6 /ml) were incubated for 30 min with NDS27 and HP β CD at different tested concentrations and the cell viability was estimated by the Trypan blue exclusion test [128].

Stimulation of equine PMNs and HL-60 cells

Two methods were used to stimulate the cells: each cell type was activated with phorbol myristate acetate (PMA) or with N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) in combination with cytochalasin B (CB). PMA and fMLP were dissolved in DMSO, and aliquots were kept refrigerated at -20 °C. Just prior to use, distilled water (dH₂O) was added to the aliquots to obtain a stock solution of PMA (1.6×10^{-5} M) with 1 % DMSO and a stock solution of fMLP (10^{-4} M) with 10 % DMSO. Adequate volumes of these stock solutions were added to the neutrophil suspensions to reach the final concentration of 8×10^{-7} M PMA and 0.05 % DMSO or 10^{-6} M fMLP and 0.1 % DMSO. The effect of the vehicle DMSO solution was studied and compared to the control cell suspension in PBS buffer [3].

Chemiluminescence: measurement of O₂^{•-} production

The O₂^{•-} production by activated neutrophils was measured by chemiluminescence (CL) as previously reported [2]. In a first group of experiments, the neutrophil suspensions (10^6 neutrophils/ml HBSS) were incubated for 10 min at 37°C with NDS27 or HP β CD at the final concentration of 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} M. After the incubation, the neutrophil suspensions were centrifuged (450 x g, 10 min, 20 °C), the supernatants were removed in order to discard the NDS27 which was not taken up by the cells, and the neutrophil pellets were resuspended to

obtain 10^6 neutrophils in 200 μ l HBSS. The neutrophil suspensions were distributed in the wells (10^6 neutrophils per well) of a 96 microtiter plate (White Combiplate 8, Thermo Labsystems) and 25 μ l CaCl_2 (7.5 μ M), 2 μ l lucigenin (5 μ M) and 10 μ l PMA (1.6×10^{-5} M) were added. Just after PMA addition, the CL response of neutrophils was monitored during 30 min and expressed as the integral value of the total CL emission. In a second group of experiments, the neutrophil suspensions (10^6 neutrophils/well) were incubated for 10 min in the wells with NDS27 or HP β CD at the final concentration of 10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} and 10^{-6} M. Then, the CL was monitored during 30 min in the presence of the NDS27 or HP β CD, after addition of CaCl_2 , lucigenin and PMA. Control assays taken as 100 % of CL response were performed with neutrophils treated in the same conditions but where the drug solutions were replaced by dH_2O (drug vehicle).

Fluorescence measurement of ROS production

The effect of NDS27 on the ROS production by activated HL-60 cells or equine PMNs was studied and compared to HP β CD and distilled water (dH_2O) used to dissolve the drug. Two types of experiments were performed with the two cell models.

Assays on HL-60 cells

Twenty μ l solution of not fluorescent probe DCFH-DA (41 μ M) were added to 10^6 HL-60 cells in the 24-well microplate, which was kept in the incubator at 37 °C for 45 min in the dark. For the experiments investigating the intracellular activity of NDS27, 10 μ l of the drug or HP β CD (at the final concentration of 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M) versus dH_2O , were pre-incubated together with the probe. The content of each well was transferred into a 5 ml-tube for centrifugation (300 g, 10 min at 37°C). The supernatant containing the excess of the probe, NDS27 or HP β CD was discarded. The recovered cell pellet was suspended in 500 μ l HBSS buffer and put into the wells (total volume 950 μ l). In contrast, the second experiment consisted in adding 10 μ l of NDS27 or HP β CD versus distilled water (dH_2O as vehicle) to the cellular suspension after centrifugation and washing steps. Thereafter, in both cases, 10 μ l HRP (30 μ g/ml) were added prior to 30 μ l PMA (5.10^{-7} M) employed as a trigger of HL-60 cells activation. The fluorescence produced was monitored with a Fluoroskan (Fluoroskan Ascent FL, Fischer Scientific, Tournai-Belgium) for 30 min at 37°C, at the emission wavelength of 555 nm (excitation wavelength was 485 nm).

Assays on PMNs

After equine PMNs isolation as described above [127], cellular suspension was transferred into 24-well plates at the cellular concentration of 2.10^6 cells/ml and per well. The first type of experiments consisted in performing a 20-min period of pre-incubation of NDS27 or HP β CD at various concentrations (10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M) together with cells and probe (20 μ l DCFH-DA, final concentration of 41 μ M) at 37°C. Afterwards, cells were washed with 400 μ l HBSS to discard NDS27 or HP β CD which were not taken up by the cells, and suspended again with 980 μ l HBSS prior to the activation with 20 μ l PMA (3.10^{-7} M final concentration). In the second set of experiments, equine neutrophils (2.10^6 cells/ml) were pre-treated with the probe (20 μ l DCFH-DA, final concentration of 41 μ M) for 20 min at 37°C. Thereafter, cells were washed (400 μ l) then suspended (970 μ l) with HBSS, and 10 μ l of NDS27 or HP β CD, at the final concentration of 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M, were added before activation with 20 μ l PMA (3.10^{-7} M final concentration). Controls were made with dH₂O. In this latter experiment, the drug being tested remained within the system during the kinetics measurement of fluorescence for 30 min.

Measurement of total MPO released by activated neutrophils and HL-60 cells

The neutrophils or HL-60 cells suspension (10^6 cells/ml) were incubated for 10 min at 37°C with NDS27 or HP β CD at the final concentration of 10^{-4} , 10^{-5} , 5×10^{-6} and 10^{-6} M and then activated either with 8×10^{-7} M of PMA or with a mixture of CB (10^{-5} M) and fMLP (10^{-6} M) both for 30 min at 37°C. After the activation, the PMNs or HL-60 cells suspensions were centrifuged (450 x g, 10 min) and the supernatants collected for the measurement of MPO released by the cells. An original ELISA assay was used to measure MPO [109]. Briefly, polyclonal antibodies against equine or human MPO were coated on 96 wells microtiter plates. Samples were added into the wells and incubated overnight at 4°C. After washing, a second anti-equine or anti-human MPO polyclonal antibody raised in guinea pig and coupled to alkaline phosphatase was added and incubated 2 h at 37°C. After washing, phosphatase activity was measured after incubation (25°C, 30 min in the darkness) with a paranitrophenyl phosphatase solution. Absorbance (405 nm) was read with the Multiscan Ascent (Labsystem).

Measurement of active MPO by SIEFED

Cells were prepared as described above. MPO activity was measured by an original method called SIEFED (“Specific Immunological Extraction Followed by Enzymatic Detection”) developed for the specific detection of active equine neutrophils MPO [56] and active human MPO [57]. The method is a three-steps procedure: firstly, the extraction of MPO out of a solution or a biological sample by its capture on specific immobilized antibodies, secondly, washings to eliminate unspecifically bound compounds or interfering substances and, thirdly, the detection of MPO enzymatic activity by using H₂O₂ as substrate, Amplex Red as fluorogenic electron donor and nitrite as enhancer of the reaction. The MPO activity was measured in samples of the same supernatants which were collected for the total MPO measurement. Sample to test were loaded on the SIEFED microplate, and incubated (2h, 37°C) to allow the capture of MPO by the antibodies. After washings (elimination of the incubation milieu), the enzymatic activity of MPO was measured. A control assay with PBS alone was taken as 100 % of MPO release. A control assay with dH₂O was also performed, and no significant difference was observed between PBS and dH₂O control.

Quantification and measurement of the intracellular active MPO present in equine PMNs and HL-60 cells

10⁶ PMNs or HL-60 cells were sonicated 6 x 10 sec at 90 W (Labsonic P, Sartorius) and centrifuged (10 min, 450 x g). Supernatant was used for measurement of total and active MPO as described above.

HPLC quantification of NDS27 incorporated into the cells

10⁸ PMNs or HL-60 cells were suspended in 2 ml PBS added with NDS27 (3.5 x 10⁻³ M). The suspensions were incubated 30 min at 37°C and then centrifuged (10 min, 400 x g), the supernatants were recovered for curcumin quantification. The cell pellets were washed twice with 1 ml of PBS followed by centrifugation (10 min, 400 x g), and the 2 ml recovered were pooled for HPLC measurement. Cells were resuspended in 3.5 ml of PBS, sonicated 6 x 10 sec with an amplitude of 30 % (Labsonic P, Sartorius) and centrifuged (10 min, 10,000 x g, 4°C). Pellets containing granules, nuclei and unbroken cells were resuspended in 1 ml of methanol to precipitate proteins and after centrifugation (10 min, 10,000 x g, 4 °C) the supernatant was recovered. The supernatant was ultracentrifuged (1 h, 165,000 x g, 4 °C) to separate cytosolic and membrane fractions. As described before, proteins from each fraction

were eliminated by precipitation with methanol (3 vol methanol for 1 vol of cytosolic or membrane fraction) followed by centrifugation (10 min, 10,000 x g, 4°C). The supernatants obtained were lyophilized and then solubilized in 100 % methanol.

The dosage of curcumin was performed by HPLC. The HPLC system included a Merck Hitachi L-600A solvent delivery system (pump) working at flow rate of 0.7 ml/min, a Merck Hitachi L-4000 U.V. detector and a 7125 rheodyne injector with a 20 µL loop volume. The Merck Hitachi D-2000 Chromato Integrator data station software was utilized for integration. Chromatography was achieved by using a Merck LichroCart® 125-4 LiCrospher® 100 RP-18 (5 µm) column with an isocratic elution with tetrahydrofuran (THF): 50 mM citrate buffer (pH=6) (66:34) and detection at 419 nm using a U.V. detector.

Statistical analysis

Data are given in relative values (%) in reference to appropriate activated (A) control groups defined as 100 %. All data are expressed as mean ± standard deviation (S.D.) of at least two independent experiments made with different blood or cell batches and carried out at least in duplicate. A one-way analysis of variance ANOVA, Dunett multiple comparison test was performed with the GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego California, USA). A Kruskal-Wallis test was realized for data that did not respect a gaussian distribution. A p-value <0.05 was considered as significant.

Results

Effect of NDS27 and HPβCD on the cell viability

The neutrophil and HL-60 mortalities in HBSS were 5.3 % and 2.6 %, respectively. NDS27, dH₂O and HPβCD had no significant effect on cell viability whatever the used concentration.

Effect of NDS27 and HPβCD on the O₂^{•-} produced by activated equine PMNs measured by chemiluminescence (CL)

For this experiment, NDS27 and HPβCD were pre-incubated 10 min with the cells and eliminated before stimulation or let in the cell suspension during stimulation. NDS27 had a dose-dependent inhibitory effect on the O₂^{•-} produced by PMA-stimulated neutrophils compared with activated control cells. The inhibitory effect was stronger when NDS27 was let into the medium during the stimulation of the cells (Figure 35B) than after its removal (Figure 35A). In the two models, the inhibitions were always significant except for the lowest

concentration (10^{-6} M) when NDS27 was eliminated before cells stimulation. The HP β CD did not show any significant effect except at the highest concentrations of 10^{-4} and 5×10^{-5} M when it was let into the medium during the cells activation (Figure 35B). When the distilled water (dH₂O) was eliminated before activation, we observed a significant inhibition of O₂•⁻ production compared to the activated control cells.

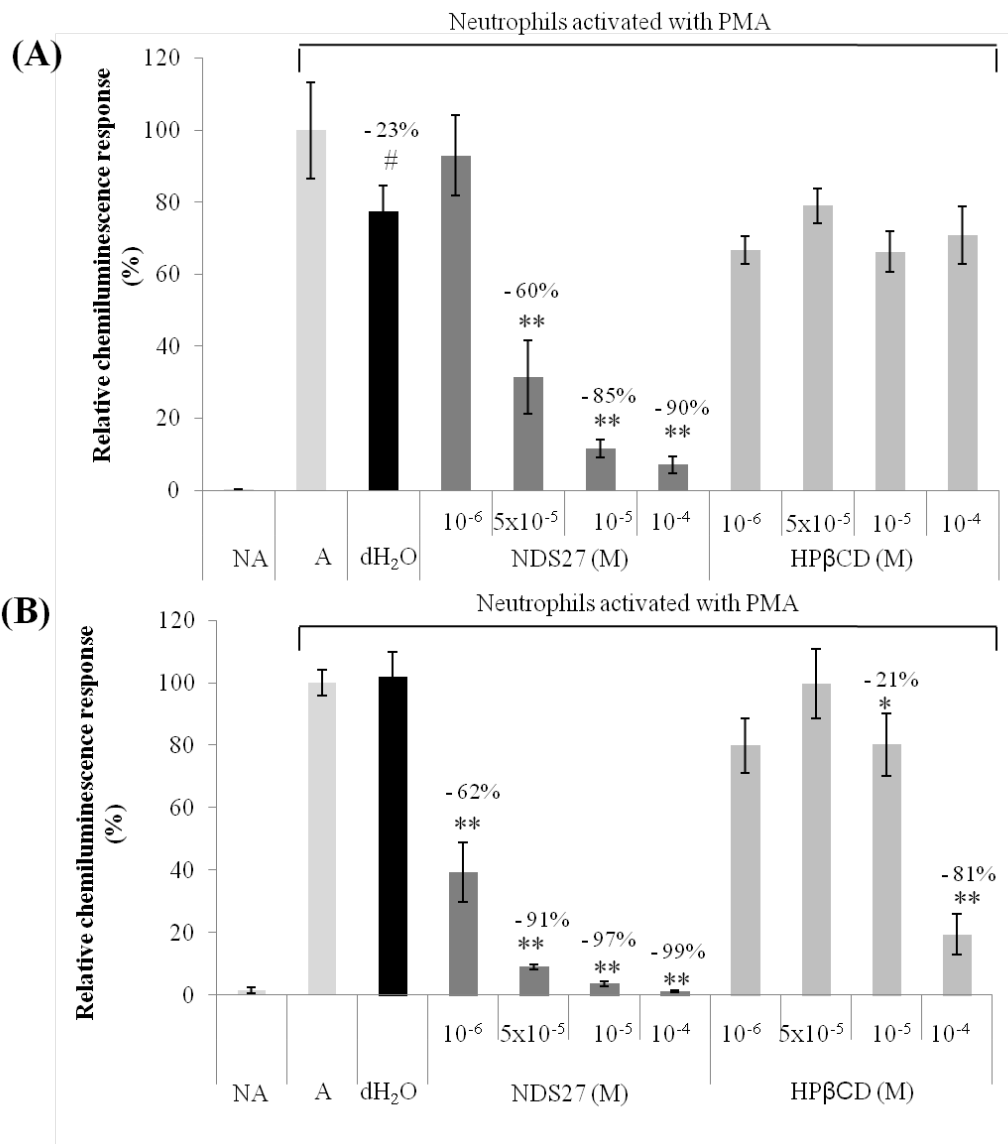


Figure 35. (A) Effect of NDS27 and HP β CD on the chemiluminescence response of 10^6 PMNs stimulated by PMA. NDS27 and HP β CD were pre-incubated 10 min with the cells and eliminated before stimulation or (B) let in the cell suspension during stimulation. All the concentrations of NDS27 are expressed in terms of molar concentration of pure curcumin. The percentages of inhibition indicated on the top of each column were calculated versus dH₂O vehicle control taken as 100 %, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, except for dH₂O which was calculated versus activated control cell # $p < 0.05$. Data are given as means \pm S.D. of two separate experiments made in triplicate each ($n=6$). NA: not activated cells; A: activated cells.

Effect of NDS27 and HP β CD on ROS induced fluorescence by activated HL-60 and equine PMNs

The fluorescence intensity measured with 10^6 non activated neutrophils was 0.41 ± 0.14 relative units (RU) and 6.82 ± 2.81 RU for cells stimulated with PMA. For HL-60 cells the fluorescence values were 25.4 ± 5.63 RU for non activated cells (2×10^6) and 72.06 ± 1.69 for activated cells. To compare the activation of both cell types, we calculated the absolute fluorescence ratios (activated/non-activated cells) and the following ratios were obtained: 19.24 ± 13.02 for PMNs and 2.94 ± 0.64 for HL-60 cells respectively.

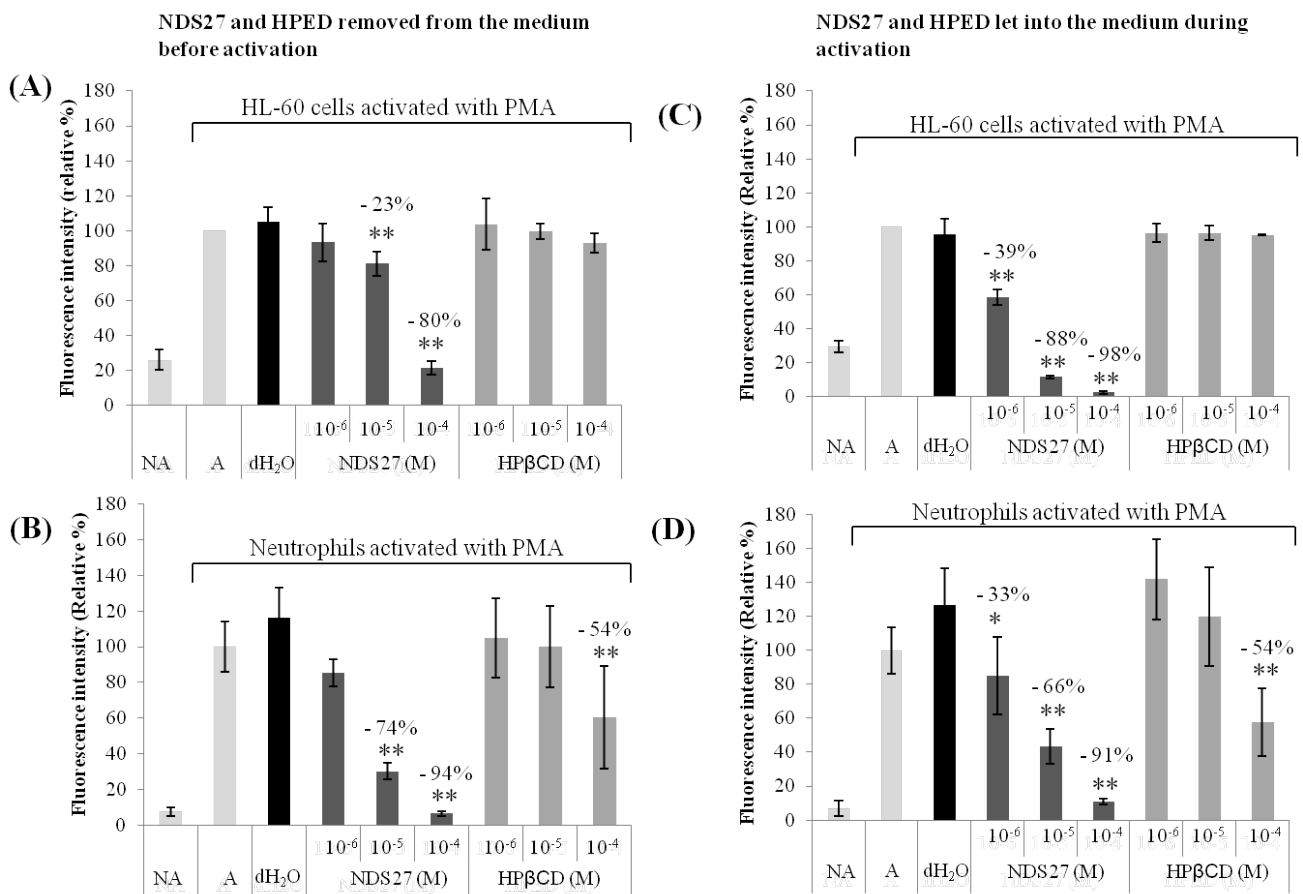


Figure 36. Effect of NDS27 and HP β CD on ROS-induced fluorescence by 10^6 HL-60 cells or 2.10^6 PMNs stimulated by PMA. Either NDS27/HP β CD was pre-incubated for 45 min with the HL-60 cells (A) or 20 min with the PMNs (B) and eliminated before stimulation followed by fluorescence measurement; either NDS27 was let in the cell suspension (HL-60 cells (C) or PMNs (D)) during stimulation followed by fluorescence measurement. All the concentrations of NDS27 are expressed in terms of molar concentration of pure curcumin. The percentages of inhibition indicated on the top of each column were calculated versus dH₂O vehicle control taken as 100 %, *p<0.05; ** p<0.01. Data are given as means \pm S.D of two separate experiments made in triplicate each (n=6). NA: not activated cells; A: activated cells; dH₂O: distilled water.

Compared to control cells activated with PMA (A), the fluorescence intensity decreased in the presence of NDS27 (Figure 36A, B, C, D). The experiment performed with increasing concentrations of NDS27 or HP β CD, but removed from the medium before activation, showed that NDS27 had an important inhibitory effect (-80 %) on the ROS-induced fluorescence intensity of activated HL-60 cells, but only at 10^{-4} M ; at 10^{-5} M, the inhibition was moderate, and not significant at 10^{-6} M. No effect was observed with HP β CD even at the highest concentration of 10^{-4} M (Figure 36A). On stimulated equine PMNs, the tested drug induced an inhibition of the ROS-induced fluorescence, in a concentration-dependent manner (Figure 36B). At 10^{-5} and 10^{-4} M of NDS27, the inhibitory percentages were -74 % and -94 %, respectively. Distilled water (dH₂O) and HP β CD had no inhibitory effect on activated PMNs, except for HP β CD at the highest concentration of 10^{-4} M (Figure 36B). As we observed a strong inhibition of the ROS-induced fluorescence intensity with activated neutrophils pre-incubated with NDS27 and not with activated HL-60 cells, we investigated further the effect of identical final concentrations of NDS27 let in the cellular suspension during the activation and the fluorescence measurement. In both cases, increasing concentrations of NDS27 (10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} M) resulted in a concentration-dependent inhibitory effect on the ROS produced either by activated HL-60 cells (Figure 36C) or equine PMNs (Figure 36D). In both cell models, HP β CD did not significantly affect the ROS production, except at 10^{-4} M in the PMNs model (Figure 36D). The inhibition by NDS27 was significant for all tested concentrations and quite similar in both types of cells but with a greater effect on HL-60 cells. No significant difference was observed between the PMA-activated cell controls in the absence (A) or the presence of distilled water (dH₂O).

Quantification and measurement of the intracellular activity of MPO in equine PMNs and HL-60 cells

In equine PMNs we found a variable concentration of MPO, depending on the batch of neutrophils. The mean of total and active MPO measured in PMNs were respectively 8766.06 ± 4292.07 ng/ml (n=8) and 758.89 ± 506.97 ng /ml (n=8) with a specific activity of 0.023 ± 0.015 U/mg protein. The concentration of total and active MPO found in HL-60 is quite constant and almost identical: 797.14 ± 99.61 ng/ml (n=8) for total MPO and 807.51 ± 120.74 (n=8) ng/ml for active MPO with a specific activity of 0.16 ± 0.02 U/mg protein.

Comparison of the effect of NDS27 and HP β CD on the release of MPO by activated neutrophils and HL-60 cells

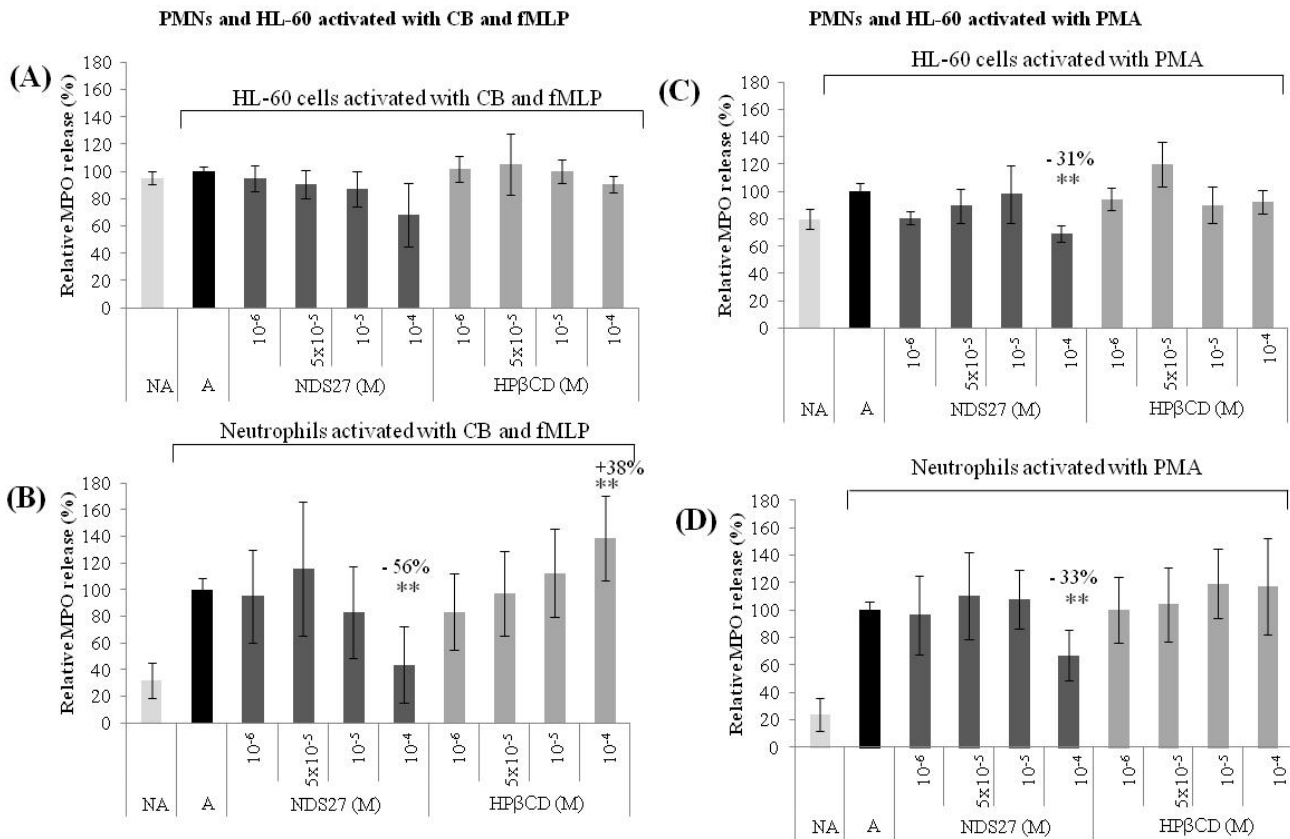


Figure 37. Effect of NDS27 and HP β CD on the MPO released by 10⁶ HL-60 cells (A, C) or 10⁶ PMNs (B, D) stimulated with PMA or a combination of CB and fMLP. All the concentrations of NDS27 are expressed in terms of molar concentration of pure curcumin. The percentages of inhibition indicated on the top of each column were calculated versus dH₂O vehicle control taken as 100 %, *p<0.05; ** p<0.01. Data are given as the means \pm S.D. of three separate experiments made in duplicate each (n=6) for HL-60 cells and of six experiments made in duplicate each (n=12) for PMNs. NA: not activated cells; A: activated cells.

Regardless of the activator used, NDS27, at 10⁻⁴ M, inhibited the degranulation of equine PMNs and HL-60 cells, which was evidenced by the decrease of released MPO, compared to control cells activated with CB and fMLP (Figure 37A and B) or PMA (Figure 37C and D). While the stimulation of PMNs induced a significant release of total MPO, we did not measure a more important release of total MPO in activated HL-60 cells compared to non-activated ones. HP β CD did not show any significant effect on PMNs or HL-60 cells degranulation, except at 10⁻⁴M with PMNs activated with CB/fMLP.

Comparison of the effect of NDS27 and HP β CD on the activity of MPO released by equine PMNs and HL-60 cells

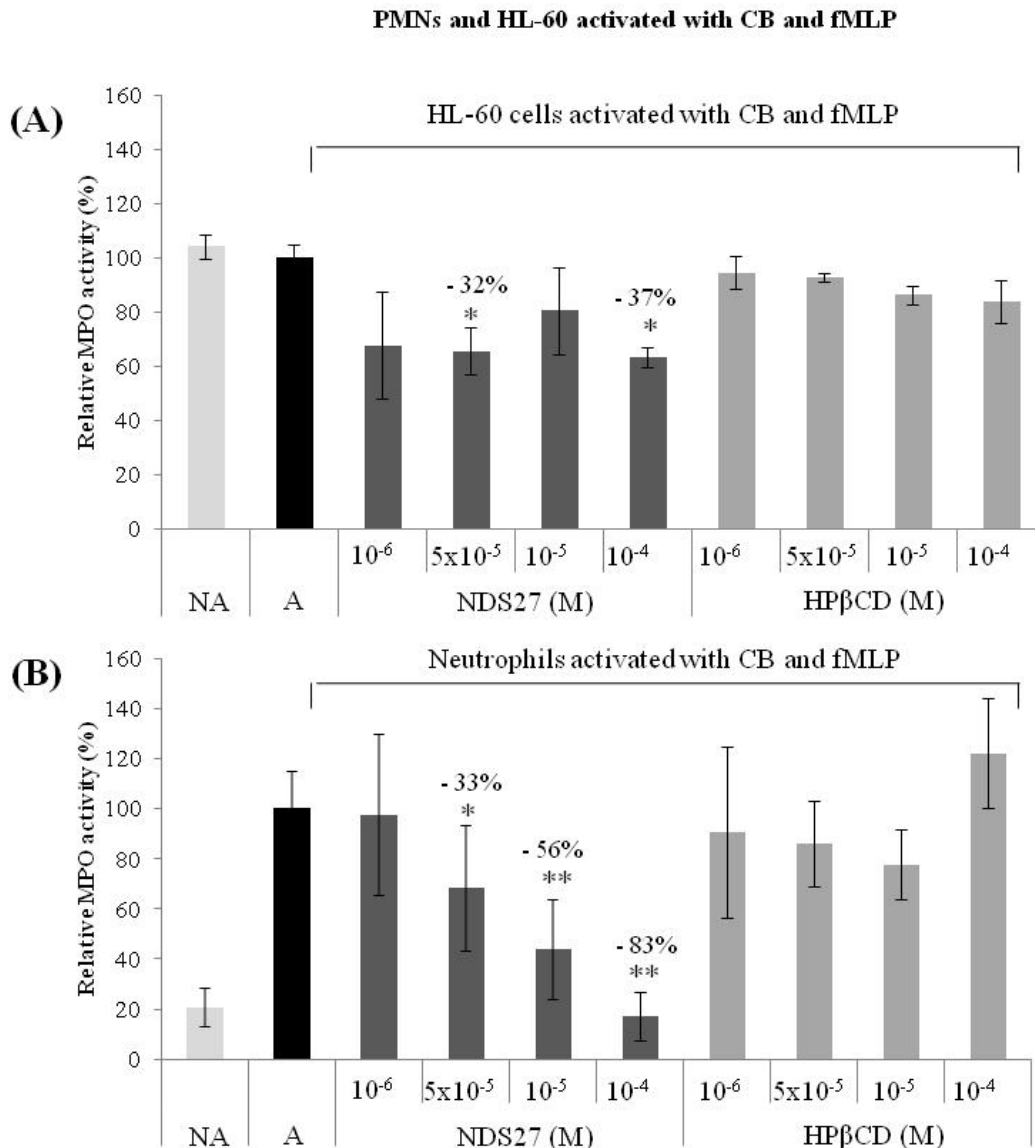


Figure 38. Effect of NDS27 and HP β CD on MPO activity released by 10^6 HL-60 cells (A) or PMNs (B) stimulated with a combination of CB/fMLP. All the concentrations of NDS27 are expressed in terms of molar concentration of pure curcumin. The percentages of inhibition indicated on the top of each column were calculated versus dH₂O vehicle control taken as 100 %, *p<0.05; ** p<0.01. Data are given as the means \pm S.D. of two separate experiments made in duplicate each (n = 4) for HL-60 cells and of four experiments made in duplicate each (n = 8) for PMNs. NA: not activated cells; A: activated cells.

Since PMA is not appropriate to study the release of active MPO by equine neutrophils [3, 129], we used only the stimulating conditions with CB/fMLP to study the effect of NDS27 and HP β CD on the release of active MPO. Compared to control cells activated with CB/fMLP,

NDS27 inhibited the MPO activity of HL-60 cells irrespective of the tested concentrations (Figure 38A). On the contrary, NDS27 decreased in a dose-dependent way the activity of MPO released by PMNs (Figure 38B). HP β CD did not influence the activity of MPO released by both cell types. As for total MPO (Figure 37), the stimulation of PMNs with CB/fMLP induced a release of active MPO, while it did not for HL-60 cells.

Capacity of NDS27 to enter into the cells

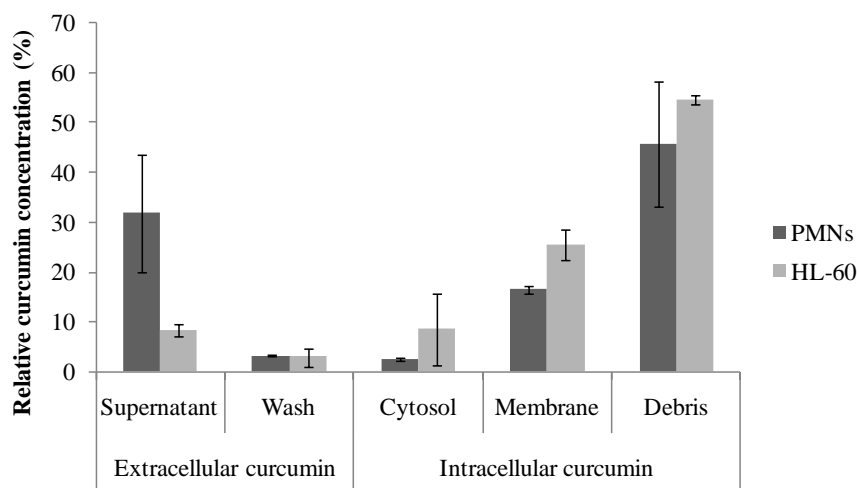


Figure 39. Quantification of curcumin from NDS27 that enters or not into PMNs or HL-60 cells after incubation. Supernatant: curcumin found in supernatant after 30 min incubation with cell. Wash: curcumin recovered after two washing steps of the cells. Cytosol and Membrane: NDS27 found in cytosolic and membrane fractions respectively after ultracentrifugation of sonicated cells. Debris: curcumin found in granules, unbroken cells and nuclei. Data are expressed in relative percentage versus the sum of the amounts of curcumin found in the different fractions (taken as 100 %) and are given as the mean \pm S.D. of two separate experiments (n=2).

Compared to the sum of curcumin contents found in different fractions and taken as 100 %, the supernatant and the wash fractions contained respectively 31.80 and 3.19 % of curcumin for PMNs and 8.35 and 2.95 % for HL-60 cells. The part of curcumin that did not enter into the cells thus represented 34.99 % for PMNs and 11.30 % for HL-60 cells. After sonication of the cells and two steps of centrifugation, cytosolic fraction, membrane fraction and debris were isolated and curcumin was quantified in the different fractions. For PMNs, 2.48 % of curcumin were found in the cytosol, 16.49 % in the membrane and 45.65 % in the cellular debris, containing granules, nuclei and unbroken cells. For HL-60, the relative concentration of curcumin found in different fractions were: 8.55 % in the cytosol, 25.49 % in the membrane and 54.60 % in the cellular debris. The total relative amount of curcumin that enters into PMNs and HL-60 was respectively 64.62 % and 88.64 % which corresponds

to a concentration of 2.26×10^{-3} M of curcumin for PMNs and 3.10×10^{-3} M for HL-60, as the initial concentration of NDS27 added was 3.5×10^{-3} M.

Discussion

Several strategies have been developed to fight against the so-called "oxidative stress", an excessive ROS production by monocytes and neutrophils, occurring mainly during inflammatory pathologies [25, 28, 120]. A few data regarding the use of synthetic compounds and some new molecules mimicking antioxidant enzymes have been reported for successful application in human. The results regarding the use of vitamins (A, C and E) and dietary compounds, in multiple antioxidant supplementation studies, were controversial and in some cases showed increased mortality [130, 131]. That comes to deal with what kind of antioxidant might be used safely and on what target? Most of the studies on antioxidant compounds focus on their capacity to neutralize ROS, without information on their capacity to act on the intracellular enzymes producing ROS. The new insight is that cellular enzymes such as NADPH oxidase and myeloperoxidase found in neutrophils can be considered as targets to modulate the excessive ROS production in a reversible manner. Therefore, there is a growing interest to find molecules that are able to modulate oxidant response without harmful effects. Among them, polyphenols are valuable candidates. Curcumin, belonging to the polyphenol family, is described for its anti-oxidant [31, 75, 123], anti-inflammatory [75, 77, 122] or anti-cancer [77, 122, 123] activities. However, the mechanism responsible for its antioxidant action is not completely elucidated. The interest of the present work was to study the antioxidant effect of the newly developed water-soluble curcumin compound, NDS27, on the oxidant response of neutrophils playing a key role in the inflammatory response. The effects on PMNs were compared to those on promyelocytic HL-60 cells, used as a cellular model for antioxidant screening tests as previously reported by Teufelhofer *et al.* [100].

First, by using lucigenin-dependent chemiluminescence and the intracellular fluorescent probe DCFH-DA [101, 132], we study the effect of NDS27 on $O_2^{\bullet-}$ and other ROS produced by the cells. When NDS27 was removed from the medium before cells activation with PMA, a concentration-dependent inhibition of ROS production was observed, showing an intracellular action of the drug. During cell stimulation in presence of NDS27, the fluorescence technique did not showed an increase of the inhibitory effect for PMNs but

well for HL-60 cells suggesting a major intracellular effect of NDS27 for PMNs and a major extracellular effect for HL-60. Compared to PMNs, HL-60 cells were poorly activated by PMA and their ROS-induced chemiluminescence and fluorescence signal remained very weak explained by a lower activity of NADPH oxidase in HL-60 cells than in PMNs [103, 104]. In the reaction medium used for the fluorescent assay with HL-60, HRP was added to amplify the peroxidase-dependent oxidation of DCFH [102]. We cannot exclude the possible extracellular interaction between NDS27 and the HRP by-products as it has been already reported that curcumin is able to scavenge oxoferryl species arising from the reaction of H_2O_2 and HRP [133, 134].

When HP β CD alone was let in the medium, an inhibitory effect on ROS production was only observed with PMNs at the highest concentration of 10^{-4} M. HP β CD could affect the membrane structure and therefore influence the mechanisms linked with neutrophils stimulation. Indeed, cyclodextrins have been reported to modulate adhesion and ROS produced by human immune cells by their cholesterol depleting ability [135, 136]. Based on our chemiluminescence and fluorescence findings, it can be suggested that NDS27 exerts its ROS inhibitory activity both on the extracellular and intracellular levels, that is in accordance with the extracellular ROS scavenging activity already reported with curcumin [31, 75]. Our results also indicate that NDS27 and HP β CD at 10^{-4} M interact more with PMNs than HL-60 cells that rise questions about the membrane interaction with NDS27 or the permeability of the cell to the drug. To go further in the understanding of the mechanisms of action of NDS27 towards ROS production, we were interested to answer the following question: Does NDS27 enter into PMNs and HL-60 cells?

We checked, by HPLC, the ability of curcumin from 3.5×10^{-3} M NDS27 to enter into the cell or to bind to the membrane. It was observed that curcumin entered more easily in HL-60 cells (88.64 %) than in PMNs (64.62 %). These results show that NDS27 interacts with cell surface and, in a lesser extent, enters inside the cell during incubation period. It has been previously shown that curcumin can be easily incorporated into the cell membrane because of its high lipid solubility [137] and that the incorporation modifies the properties of the host cell membrane and affects the activity of several membrane proteins [78, 116]. The difference of incorporation of the molecule in the plasma membrane between both cell types can be explained by differences in lipid [106] and protein [107] compositions or by the

higher amount of cholesterol found in proliferative cells as HL-60 [108]. The intracellular effect of NDS27 can thus be explained by a modification of the PMNs and HL-60 cell membrane by NDS27 itself and partially by HP β CD. Indeed, depletion of cholesterol by HP β CD could disturb the cell membrane and affect membrane microdomains [138] which are important for NADPH oxidase assembly [118]. The presence of curcumin in cell membrane and cytosol could interfere with the intracellular mechanisms of ROS production by neutrophils. Curcumin is known to decrease the expression of several pro-inflammatory enzymes like cyclooxygenase-2 (COX-2), 5-lipoxygenase (5-LOX), and inducible NO-synthase (iNOS), most likely through the down-regulation of NF- κ B activation [76, 112, 139]. Beside, curcumin inhibits numerous protein kinases, including protein kinase C [76, 111, 112]. We can also suggest that curcumin present inside the cells, can directly act by scavenging ROS or by acting on the enzymes responsible for ROS production such as MPO or NADPH oxidase present in cellular and granule membranes.

By using ELISA and SIEFED techniques validated for equine and human MPO, we measured the content of total and active MPO in both cell types and their release by stimulated cells with different activation systems, one with PMA having a direct allosteric effect on PKC involved in the activation of NADPH oxidase and the other one with the combination CB/fMLP to mimic the receptor and cytoskeleton dependent stimulating pathways of neutrophils [3]. Although HL-60 cells contained MPO with a specific activity even superior to that of equine PMNs, we were first arrested by the inexistent or poor release of total and active MPO by stimulated HL-60 cells in comparison to non-stimulated ones. On the contrary, the stimulation of PMNs induced an important release of total and active MPO. These results evidenced again a different sensitivity of both cell types towards the stimulation. NDS27 and HP β CD do not have an inhibitory effect on the release of total MPO but well on the release of active MPO when CB/fMLP was used for stimulation. Therefore NDS27 does not seem to affect the degranulation process of MPO but exerts an inhibitory effect on the activity of MPO as previously observed for curcumin [2].

Overall, our results demonstrate that the new water-soluble form of curcumin, NDS27, without affecting cell viability, has a particular ability to cross the cell membrane and interact with it, leading to the inhibition of the extra- and intracellular ROS production by stimulated neutrophil and HL-60 cells. However, the molecule has a different behaviour

depending on the cell type. Although NDS27 interacted more easily with HL-60 cells, the molecule had a more important effect on stimulated neutrophils, which have a stronger NADPH oxidase-dependent ROS production and release of MPO. We evidenced that NDS27 acts more on the activity of MPO than on the mechanisms involved in its degranulation that put in light the potential role of curcumin in the inhibition of the activity of MPO released by PMNs. Further experiments are needed to know whether the inhibition of MPO already begins inside the cells.

Finally, we can hypothesize an activity of NDS27 or curcumin on NADPH oxidase as the molecule can interact with the membrane. It was shown that curcumin reduces the thickness of the membrane, its mobility and its elasticity, that may affect the function of membrane proteins [78, 116, 137] and a partial inhibition on the PKC activity by curcumin has been largely demonstrated [75, 111, 140]. But further experiments are required to transpose these observations to NDS27, which is largely more soluble compared to curcumin. In NDS27, cyclodextrin (HP β CD) could help to inhibit the ROS production by PMNs. This latter assertion is sustained by recent studies which demonstrated that cyclodextrin affects the membrane integrity and causes cholesterol depletion in lipid raft, resulting in a decreased translocation of cytosolic components of NADPH oxidase [118, 141].

We may conclude that NDS27 can play an important role at the membrane and intracellular levels and affect the regulation of the oxidative burst in neutrophils by acting as a scavenging agent but also by an inhibitory effect on NADPH oxidase and MPO activities involved in the oxidative burst. The modulatory effect of NDS27 towards the oxidant activity of mature cells involved in immune and inflammatory response opens therapeutic perspectives to control equine or human pathologies with excessive inflammatory reactions as already demonstrated *in vivo* in horses [4].

Article II

Curcumin and resveratrol act by different ways on NADPH oxidase activity and reactive oxygen species produced by equine neutrophils

Sandrine Derochette, Thierry Franck, Ange Mouithys-Mickalad, Justine Ceusters, Ginette Deby-Dupont, Jean-Philippe Lejeune, Philippe Neven, Didier Serteyn

Chemico-Biological Interactions 206 (2013) 186-193

Abstract

In neutrophils (PMNs), superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), the first reactive oxygen species (ROS) produced to kill pathogenic agents, is generated by NADPH oxidase, an enzymatic complex formed by the translocation of cytosolic subunits to the membrane flavocytochrome b_{558} . In horses, excessive activation of PMNs is often associated with deadly pathologies and the modulation of their ROS production by acting on NADPH oxidase is a prime target to manage inflammation. We developed a cell-free assay to measure the activity of equine NADPH oxidase assembled *in vitro*, in order to test the effects of natural or synthetic compounds on the enzyme activity or assembly. The cell-free assay was validated with diphenyleneiodonium chloride and Gp91ds-tat, two inhibitors largely described for human NADPH oxidase. The anti-oxidant effects of curcumin and resveratrol at final concentration ranging from 10^{-4} to 10^{-6} M were studied on whole cells by chemiluminescence (CL) and by cell-free assay, in which the molecule was added before or after the enzyme assembly. The CL assay demonstrated that curcumin efficiently inhibited the $O_2^{\bullet-}$ production and easily entered into PMNs or interacted with their membrane. Cell-free assay showed that curcumin acted on the reconstitution of NADPH oxidase even at 10^{-5} M, while resveratrol appeared to be an $O_2^{\bullet-}$ scavenger rather than an inhibitor of NADPH oxidase activity, since it acted from outside the cell in CL and after the complex assembly in cell-free assay. By acting directly on NADPH oxidase, curcumin should be a good candidate for the treatment of acute or inflammatory diseases involving an excessive ROS production.

Introduction

In horses as in human, micro-organisms are phagocytosed and destroyed in polymorphonuclear neutrophils by a combined action of their granule proteases and oxidant compounds mainly reactive oxygen species (ROS) [13]. Among them superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) is the first species from which most of the ROS are generated. After appropriate stimuli, $O_2^{\bullet -}$ is produced by NADPH oxidase from PMNs, a multi-component enzyme, also called Nox2, that catalyzes the reduction of O_2 by electron transfer [18]. At resting states, the components of Nox2 are distributed between membrane and cytosol. The stimulation of PMNs induces the translocation of the cytosolic components p40phox, p47phox, p67phox and the small GTPase Rac to the membrane-bound element called flavocytochrome b_{558} , formed from two subunits (gp91phox and p22phox). This translocation implies a modification in the conformation of the components and requires a complex set of protein/protein interactions [18]. The interaction between *src* homology 3 domains (SH3) of p47phox and prolin-rich region (PRR) of p22phox plays a crucial role in the activation of NADPH oxidase [18]. *In vivo*, protein kinase C (PKC) and arachidonic acid (AA) synergistically act on p47phox conformation to promote its interaction with p22phox [42]. Arachidonic acid enhances the affinity of PKC for calcium and stimulates the respiratory burst by activating the enzyme [43]. Evidence was also presented for a direct effect of anionic amphiphile like AA on flavocytochrome b_{558} [85]. Oxidant activity of neutrophils is required for their normal microbicidal function but in some inflammation cases, an excessive neutrophils stimulation may occur with the release of ROS and oxidant enzymes like myeloperoxidase (MPO) in extracellular medium, causing deleterious effect on neighbouring cells and tissues [23]. Horses are particularly sensitive to inflammation unlike other species [67] and an uncontrolled activation of neutrophils occurs in pathologies such as laminitis, recurrent airway obstructions and intestinal strangulation that is often associated with an irreversible endotoxic shock [6, 142]. A therapeutic goal could be to lower the oxidant activity of stimulated neutrophils by modulating the activity of either MPO [2] or NADPH oxidase, two enzymes responsible for ROS production. NADPH oxidase is a prime target since it produces the first ROS from which the other ROS derives and plays an essential role in the inflammatory response [29].

Among the natural compounds, curcumin and resveratrol have been widely studied for their anti-inflammatory and antioxidant capacities both in human [77, 126, 143, 144] and horses [2, 4, 59, 105]. Our team had already demonstrated the efficiency of these two polyphenols as antioxidant not only against the on ROS production but also on MPO activity and release [2, 59, 126] , and an important anti-inflammatory activity of curcumin in the recurrent airway obstruction, a horse pathology characterized by invasion of the lungs by active neutrophils [4]. The activity of curcumin and resveratrol on NADPH oxidase was described as they reduced the $O_2^{\bullet-}$ produced by cells [2, 126] but was not formally proved because the techniques that were used worked with intact phagocytes. These techniques measure the product of NADPH oxidase activation in whole cells but do not distinguish an effect of a tested molecule on membrane receptor (such as fMLP or C5a receptor [14]), on signal transduction or an $O_2^{\bullet-}$ by a scavenging effect from a direct action on the components of the NADPH oxidase complex or on its assembly. An alternative strategy is to study the NADPH oxidase activation by using a cell-free assay that differs from whole cells assays by the fact that cellular components (membrane and cytosolic subunits) are extracted from non stimulated cells, and thus the steps of NADPH oxidase activation occur *in vitro* [46].

As Heyneman *et al.* (1984) [85] published a cell-free system for NADPH oxidase from horse PMNs, we initially used this technique to test the effects of our molecules on the activity of equine NADPH oxidase, but without concluding results. So, we decided to apply to equine Nox2 the cell-free systems used to study human [86, 87, 145], porcine [89] or bovine [88] NADPH oxidase activity. The enzyme activation is realized by unsaturated fatty acids or their salts like sodium arachidonate [146]. The activity of the system is enhanced by guanosine 5'-[γ -thio] triphosphate tetralithium salt (GTP- γ -S) which allows GTP binding proteins to associate with the membrane [45].

Our purpose was to test the effects of two well-known natural compounds, i.e. curcumin and resveratrol, on equine NADPH oxidase activity by using a cell-free assay which was adapted and validated for material extracted from equine PMNs.

Material and methods

Chemicals and reagents

Analytical grade Na, K, Ca and Mg salts, dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol (CH₃CH₂OH), acetic acid and sucrose were from Merck. Dextran, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), leupeptine, guanosine 5'-[γ-thio] triphosphate tetralithium salt (GTP-γ-S), sodium arachidonate, cytochrome C from horse heart, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH), superoxide dismutase from bovine erythrocyte (SOD), resveratrol, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), lucigenin, and diphenyliodonium chloride (DPI) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Trypan blue was from ICN Biomedicals, Inc (Ohio, USA). Gp91ds-tat was from Eurogentec (Seraing, Belgium). Ficoll 400 was purchased from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Curcumin was a gift from Philippe Neven (Faculty of Pharmacy, University of Liège, Belgium).

Methods

Animals experiments

The experiments were realized on equine neutrophils isolated from whole blood drawn on citrate-phosphate-dextrose (PL146, Baxter Healthcare) from the jugular vein of healthy horses (mixed breeds, mean age 6.2 ± 2.3), fed and bred in identical conditions and not under medical treatment (Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium). Horses were considered as healthy if no clinical signs of acute disease were observed at the time of sampling. Each batch of neutrophils was obtained from 450 ml of blood drawn from one horse. The sampling was made by qualified veterinarian from the equine clinic of University of Liège in aseptic conditions without any surgery or anaesthetic procedure and risk for the animal.

Isolation of equine neutrophils

The neutrophils were isolated at room temperature (18-22°C) by two steps of sedimentation: sedimentation on dextran followed by differential sedimentation on Hypaque-Ficoll as described by Nauseef (2007) [147]. The polymorphonuclear fraction was gently collected and washed in two volumes of physiological saline solution. The cell pellets were suspended in sonication buffer [20 mM phosphate buffer pH 7,4 supplemented by 340 mM sucrose, 7 mM MgSO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 μM leupeptine]. The cell preparation

was ≥ 90 % neutrophils with a viability of 95 % as measured by the Trypan blue exclusion test [128]. The cells were used immediately after isolation and each experiment was repeated at least twice with different cell batches from different horses.

Preparation of cytosol and membrane fractions from neutrophils

Neutrophils were sonicated 3 x 10 sec with an amplitude of 30 % (Labsonic P, Sartorius) and the homogenate was centrifuged 10 min at 10,000xg (4°C). The sediment consisting of unbroken cells, granules and nuclei was discarded, and the supernatant was centrifuged at 165,000xg for 1h (4°C). Pellets containing membrane were resuspended in 3 mL of sonication buffer and frozen at -80°C for storage. The supernatant containing cytosolic proteins was also stored at -80°C. Before freezing, the protein contents were determined by the bicinchoninic acid method [148] with bovine serum albumin as standard.

Cell-free system of oxidase activation

Two μg of crude membranes and 20-60 μg of cytosolic proteins were stimulated by addition of sodium arachidonate and 2 μL of guanosine 5'-[γ -thio] triphosphate tetralithium salt (GTP- γ -S) (0-30 μM). A preliminary assay was performed with each batch to determine the optimal amount of sodium arachidonate to be added, to provide maximal oxidase activation. The cell-free assay activation was performed in 96-wells plates (microtiter assembly breakable strip, Thermo Fisher Scientific) with a total volume of 200 μL in phosphate buffered saline (PBS) + 10 mM MgSO_4 . Plates were incubated 5 min at room temperature under stirring (600 rpm), thereafter 30 μL cytochrome C (100 μM) were added. Reduction of cytochrome C was initiated by addition of 10 μL NADPH (238 μM) and followed by recording the increase of absorbance at 550 nm with a multi-plate reader (Multiscan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific) for 5 min. In parallel to each experiment, a control supplemented with 0-300 U/ml superoxide dismutase (SOD) was realized. The difference of absorbance (Δ) between the reduction of cytochrome C in presence and absence of SOD corresponds to the specific reduction of cytochrome C by $\text{O}_2^{\bullet-}$ generated by the oxidase activity. The absorption coefficient of cytochrome C at 550 nm is 21.1 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

In a first experimental condition, the tested molecules (from 10^{-6} to 10^{-4} M at final concentration) were pre-incubated 5 min at room temperature under stirring before the assembly of NADPH oxidase by sodium arachidonate and GTP- γ -S. Then cytochrome C, SOD

(for controls) and NADPH were added to measure the oxidase activity. In a second model, the tested molecules were added during 5 min under stirring after the assembly with sodium arachidonate and GTP- γ -S and the NADPH oxidase activity was measured as for the first model.

Measurement of $O_2^{\bullet-}$ production by chemiluminescence

The $O_2^{\bullet-}$ production by activated neutrophils was measured by chemiluminescence (CL) as previously reported [105]. In a first group of experiments, the neutrophil suspensions (10^6 neutrophils/ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)) were incubated for 10 min at 37°C with curcumin or resveratrol (from 10^{-6} to 10^{-4} M). After the incubation, the neutrophil suspensions were centrifuged (450 x g, 10 min, 20 °C), the supernatants were removed in order to discard the curcumin or resveratrol molecules which were not taken up by the cells, and the neutrophil pellets were resuspended to obtain 10^6 neutrophils in 200 μ l HBSS. The neutrophil suspensions were distributed in the wells (10^6 neutrophils per well) of a 96 microtiter plate (White Combiplate 8, Thermo Labsystems) and 25 μ l $CaCl_2$ (7.5 μ M), 2 μ l lucigenin (5 μ M) and 10 μ l PMA (1.6×10^{-5} M) were added. Just after PMA addition, the CL response of neutrophils was monitored during 30 min and expressed as the integral value of the total CL emission. In a second group of experiments, the neutrophil suspensions (10^6 neutrophils/well) were incubated for 10 min in the wells with curcumin or resveratrol (10^{-6} to 10^{-4} M at final concentrations). Then, the CL was monitored during 30 min in the presence of the tested molecules, after addition of $CaCl_2$, lucigenin and PMA. Control assays taken as 100 % of CL response were performed with neutrophils treated in the same conditions but without the drug.

Statistical analysis

Data are given in relative values (%) in reference to control groups consisting of reconstituted complex without the molecule (CM) or activated control group (A) and defined as 100 %. All data are expressed as mean \pm standard deviation (S.D.) of at least two independent experiments made with different cell batches and carried out at least in duplicate. Statistical analysis was realized with corresponding solvent vehicle control group as reference. An independent T-test was performed with SOFA statistics 1.3.2 (Released under open source AGPL3 licence© 2009-13 Paton-Simpson & Associates Ltd).

A Mann-Whitney test was realized for data that did not respect a Gaussian distribution. A p-value <0.05 was considered as significant.

Results

Optimization and validation of the cell-free assay for measurement of equine neutrophil NADPH oxidase activity

Optimization

We determined the optimal conditions to obtain a maximal production of $O_2^{\bullet-}$, i.e. the best concentrations of cytosolic proteins and GTP- γ -S (Figure 40). We fixed the amount of membrane protein to 2 μ g and use variable amounts of cytosolic proteins. The oxidase activity regularly increased until around 40 μ g of cytosolic proteins, and was stabilized thereafter (Figure 40, plain line curve). The production of $O_2^{\bullet-}$ also strongly increased with increasing concentrations of GTP- γ -S until 2 μ M. Thereafter, a progressive decrease of the NADPH oxidase activity was observed (Figure 40, dotted line curve).

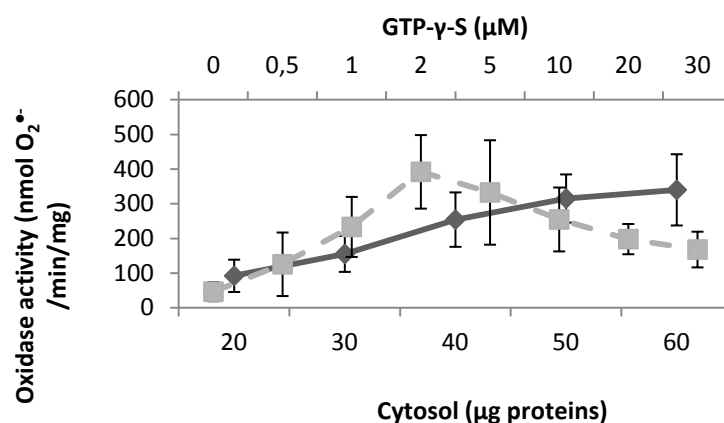


Figure 40. Dependence of the NADPH oxidase activity related to the concentration of cytosolic proteins (plain line curve) or GTP- γ -S (dotted line curve) for a constant amount of membrane proteins (2 μ g). Data are given as means \pm S.D. ($n \geq 8$).

Validation

The specificity of the cell-free assay was established with increasing concentrations of SOD to inhibit the reaction of $O_2^{\bullet-}$ with cytochrome C, and with two well-known inhibitors of the NADPH oxidase, diphenyleniodonium chloride (DPI) and Gp91ds-tat.

SOD

The production of $O_2^{\bullet-}$ decreased in relation with increasing concentrations of SOD and a plateau phase of cytochrome C reduction was observed starting from 50 U/ml. The residual activity observed over 50 U/ml SOD is not due to the reduction of cytochrome C by $O_2^{\bullet-}$ (Figure 41).

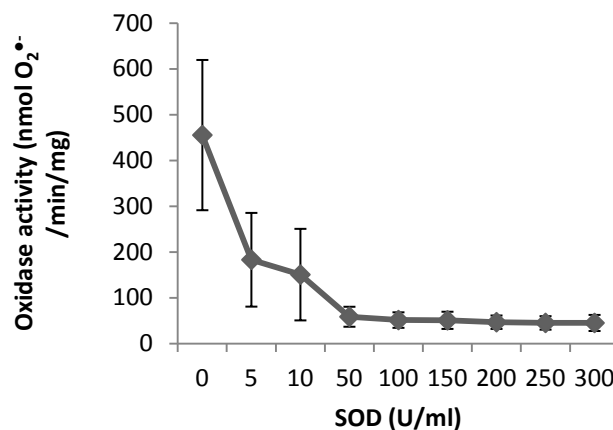


Figure 41. Dependence of the NADPH oxidase activity related to the SOD concentrations used (from 0 to 300 μ M). Data are given as means \pm S.D. of four separate experiments made at least in duplicate each ($n \geq 11$).

Diphenyleniodonium chloride (DPI) and Gp91ds-tat

Figure 42A shows that DPI inhibited, in a dose-dependent manner, the $O_2^{\bullet-}$ production by reconstituted NADPH oxidase compared to the control test incubated with ethanol alone. The inhibition was similar when DPI was present in the medium before the stimulation of NADPH oxidase by sodium arachidonate or when it was added after activation. The effect was significant at all the tested concentrations (ranging from 10^{-4} to 10^{-6} M).

Likewise, Gp91ds-tat, a chimeric peptide which inhibits of the assembly of NADPH-oxidase was studied [51]. It was thus used solely before the addition of sodium arachidonate. Gp91 ds-tat (10, 25 and 50 μ M) significantly inhibited the $O_2^{\bullet-}$ production compared to the vehicle solution of 0.9 % NaCl and 0.01 M acetic acid (Ac. Ac./NaCl), which was used to dissolve the peptide. The inhibitions were significant at all the concentrations (Figure 42B).

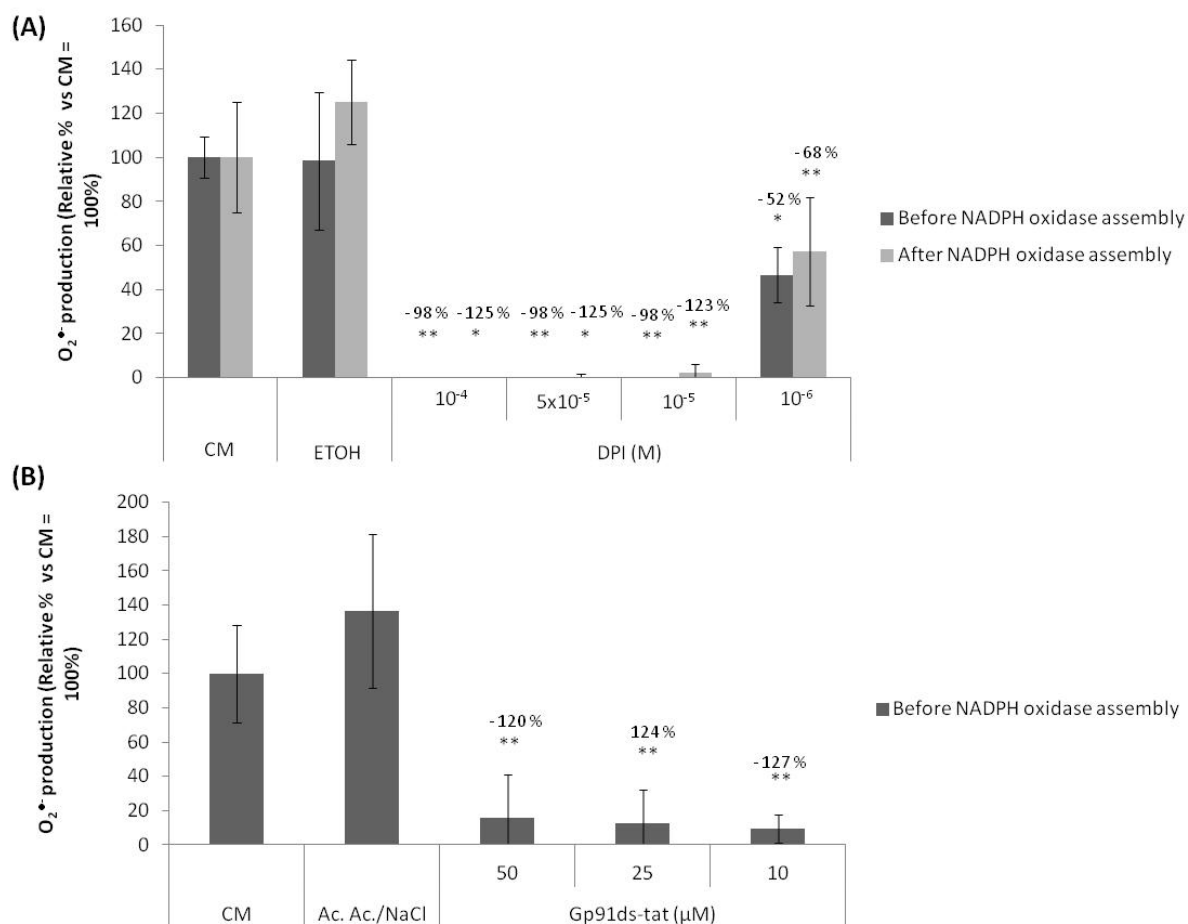


Figure 42. Effect of DPI (A) and Gp91ds-tat (B) on NADPH oxidase assembly determined by $O_2^{\bullet-}$ production in cell-free assay. DPI or Gp91ds-tat were added before (dark grey) or after (light grey) NADPH oxidase assembly. The percentages of inhibition indicated on the top of each column were calculated versus ETOH vehicle control group for DPI and Ac./NaCl vehicle control group for Gp91ds-tat, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$. CM: reconstituted complex without DPI or Gp91ds-tat. ETOH: ethanol. Ac. Ac./NaCl: Acetic Acid/NaCl solution. Data are given as means \pm S.D. ($n \geq 5$).

Effect of curcumin and resveratrol on the assembly and activity of equine NADPH oxidase

When curcumin was added after stimulation of NADPH oxidase assembly it did not affect the $O_2^{\bullet-}$ production, compared to the solvent control with DMSO, except at the highest concentration of 10^{-4} M. When curcumin was added just before the stimulation, a dose-dependent inhibition of the $O_2^{\bullet-}$ production by NADPH oxidase was observed (Figure 43A). The inhibitions were significant until 10^{-5} M, where 20 % of inhibition were still observed.

The addition of resveratrol before the stimulation of NADPH oxidase poorly affected the $O_2^{\bullet-}$ production, except at 10^{-4} M where a significant decrease of NADPH oxidase activity was observed (Figure 43B). The addition of resveratrol after the complex stimulation decreased

the $O_2^{\bullet-}$ production except at 10^{-6} M. However at 10^{-4} M, the effect of resveratrol was more important when it was added before the stimulation of NADPH oxidase assembly (52 % of inhibition) than after (33 % of inhibition).

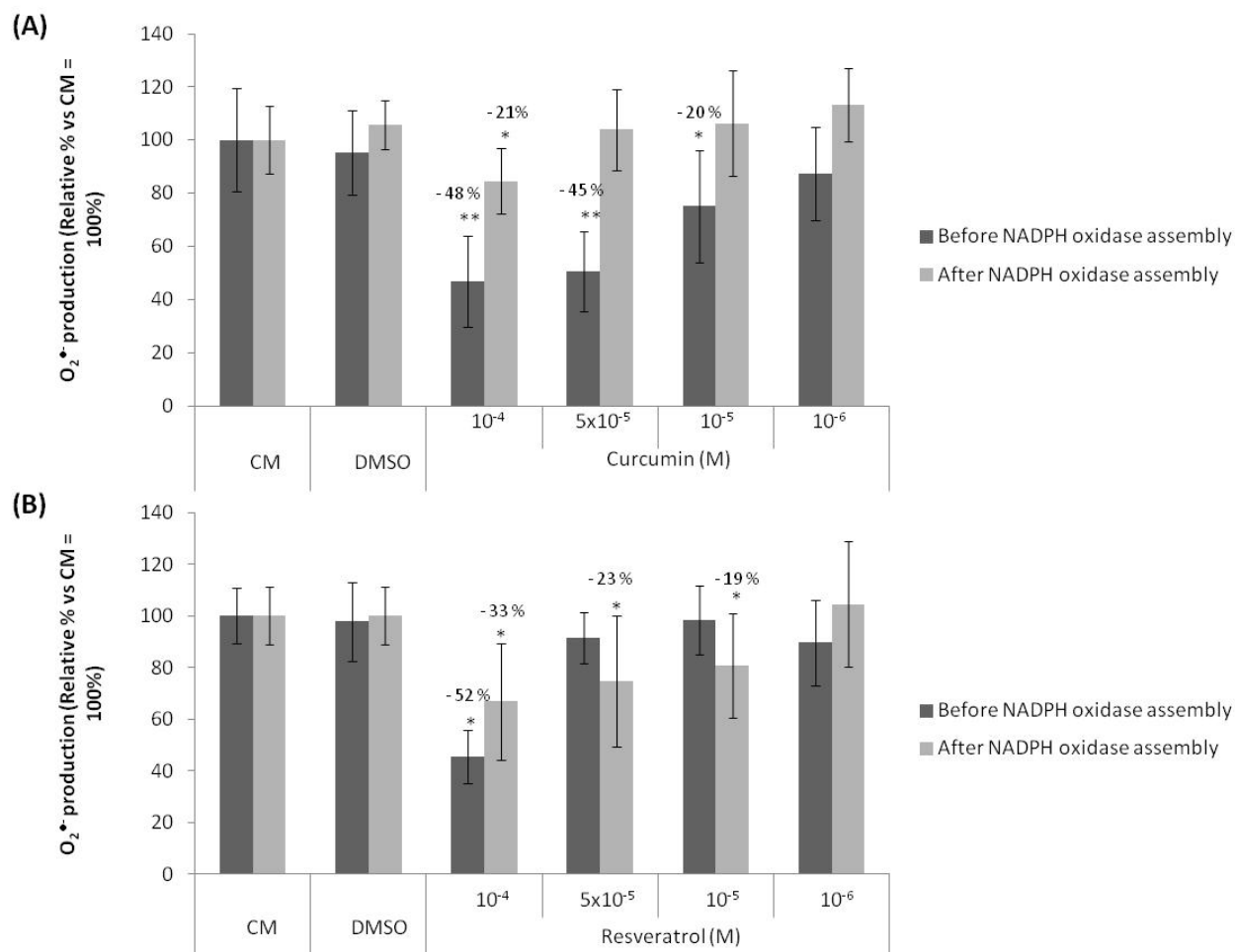


Figure 43. Effect of curcumin (A) and resveratrol (B) on NADPH oxidase assembly and activity as determined by $O_2^{\bullet-}$ production in cell-free assay. The tested molecule was added before (dark grey) or after (light grey) NADPH oxidase assembly. The percentages of inhibition indicated on the top of each column were calculated versus the respective DMSO vehicle control group, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$. CM: reconstitute complex without the tested molecule. Data are given as means \pm S.D. ($n \geq 5$).

Effect of curcumin and resveratrol on $O_2^{\bullet-}$ production by isolated equine PMNs

At all concentrations, curcumin dose-dependently and significantly inhibited the $O_2^{\bullet-}$ production by PMA-stimulated neutrophils compared to the solvent control with DMSO, with a stronger inhibitory effect when curcumin was left into the medium during the stimulation (Figure 44A). Resveratrol had a dose-dependent inhibitory effect on the $O_2^{\bullet-}$ production by PMA-stimulated neutrophils compared to control cells with DMSO, but only

when resveratrol was left in the medium during the cell stimulation. On the contrary, no effect was observed when resveratrol was eliminated by a washing step before the stimulation (Figure 44B). DMSO alone also significantly inhibited $O_2^{\bullet-}$ production compared to activated control cells (A) (Figure 44).

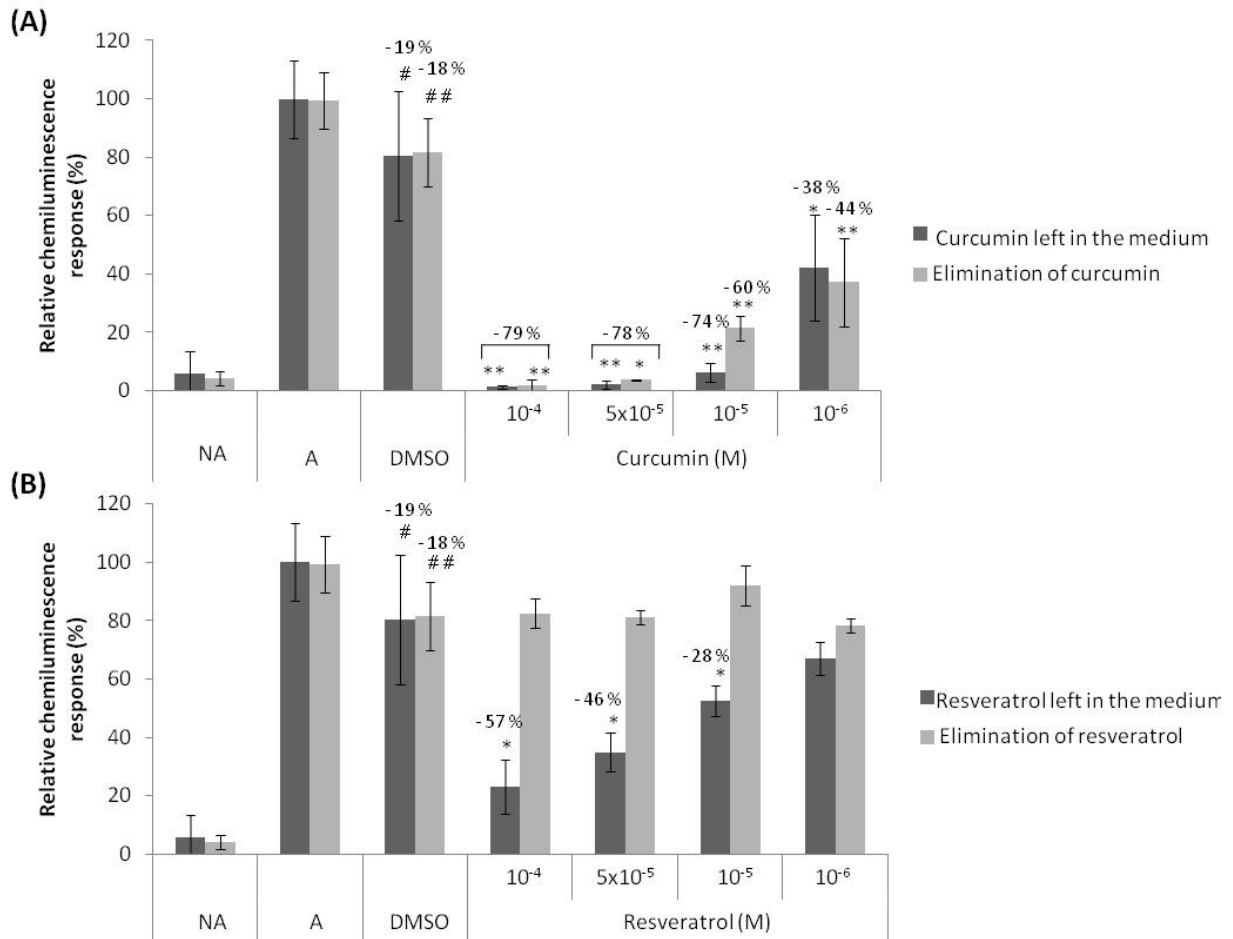


Figure 44. Effect of curcumin (A) or resveratrol (B) on the chemiluminescence response of 10^6 equine PMNs stimulated by PMA. Curcumin or resveratrol was pre-incubated 10 min with the cells and eliminated before stimulation (light grey) or left in the cell suspension during stimulation (dark grey). The percentages of inhibition indicated on the top of each column were calculated versus the respective DMSO vehicle control with $**p<0.001$, $*p<0.05$, except for each DMSO group which was calculated versus activated control cell with $##p<0.001$, $#p<0.05$. Data are given as means \pm S.D. ($n\geq 4$). NA: not activated cells; A: activated cells.

Discussion

Equine pathologies like intestinal obstruction, laminitis and recurrent airway obstruction are accompanied by an excessive PMNs stimulation leading to an oxidative stress damaging for neighbouring cells or tissues [6, 142]. The way to control oxidative stress is to act on the activity of enzymes responsible for ROS production, like NADPH oxidase [29]. However, most of the techniques used to test NADPH oxidase inhibitors are based on the measurement of $O_2^{\bullet-}$ produced by whole cells and do not allow to distinguish a direct effect on the enzyme, from an effect on receptors or on the signal transduction pathway or simply an effect of the molecule on $O_2^{\bullet-}$ [149].

As we did not obtain results with the cell-free system developed by Heyneman *et al.* (1984) [85], we developed a modified cell-free assay to specifically study equine NADPH oxidase and to evaluate the effect of molecules, i.e. curcumin and resveratrol, on the enzyme assembly or activity. For the assay, we determined the optimal concentrations of cytosolic proteins, sodium arachidonate and GTP- γ -S to be used to obtain a maximal oxidase activity. The equine cell-free assay was further validated by studying the effect of DPI and Gp91ds-tat, two inhibitors of NADPH oxidase activity [51, 150].

A ratio of 25 between cytosolic proteins (50 μ g) and membrane proteins (2 μ g) was optimal for the production of $O_2^{\bullet-}$, higher than the ratio reported by Doussière *et al.* (1992) [50] or Batot *et al.* (1995) [145] who used a ratio of 4 and 10 respectively. But the $O_2^{\bullet-}$ production in our conditions, which was 304.97 ± 94.36 nmol $O_2^{\bullet-}$ /min/mg membrane proteins, was also increased compared to that found by Doussière *et al.* (139 nmol $O_2^{\bullet-}$ /min/mg proteins) [50] or by Batot *et al.* (215 ± 21 nmol $O_2^{\bullet-}$ /min/mg proteins) [145]

As the level of activation by sodium arachidonate depends on the concentration of cytosolic and membrane components of NADPH oxidase in the extracts [88], a curve of NADPH oxidase activity related to sodium arachidonate concentration was defined for each cell extract. A bell-shaped curve was observed with a maximal activity generally obtained for 50-80 μ M sodium arachidonate, as also observed by Gillibert *et al.* (2005) [87]. For GTP- γ -S, we found that a concentration of 2 μ M was convenient for a maximal production of $O_2^{\bullet-}$, lower than 10 μ M generally used in other studies [50, 87, 92]. To ensure that the reduction of cytochrome C was specifically due to $O_2^{\bullet-}$, a control assay with SOD was done in each

experiment and its result was subtracted from the results obtained without SOD. The curve of NADPH oxidase activity in function of SOD concentration demonstrated that the $O_2^{\bullet-}$ production was undoubtedly totally inhibited with 200 U/ml (or 66 $\mu\text{g/ml}$) SOD, comparable to the SOD concentrations, between 20 and 45 $\mu\text{g/ml}$, reported in literature [85, 87, 89, 92]. To validate our cell free assay, we tested diphenyleneiodonium chloride (DPI) and gp91ds-tat recognized to inhibit the activity or the assembly of NADPH oxidase respectively. DPI, an uncompetitive inhibitor of flavoenzymes [150], efficiently inhibited the oxidase activity in our cell-free assay, albeit added before or after the NADPH oxidase assembly. DPI binds flavocytochrome b_{558} at a site close to the NADPH-binding site, prevents attachment of NADPH [91] and abstracts electron from FAD to form a radical [50]. However, if DPI is a valuable inhibitor of NADPH oxidase for *in vitro* experiments, it is toxic for cells: it inhibits the cellular metabolism by blocking mitochondrial NADH dehydrogenase and other flavoenzymes, and impaired the activity of NAD(P)-dependent enzymes [150]. Riganti et al. (2004) demonstrated that DPI, by inhibiting enzymes involved in the pentose phosphate pathway, the main antioxidant pathway of the cells, could contribute to the oxidative stress [150], even if NADPH oxidase is inhibited. Gp91ds-tat (10, 25 and 50 μM) added before the NADPH oxidase stimulation significantly inhibited the $O_2^{\bullet-}$ production, in agreement with results of DeLeo et al. [92] obtained in similar experimental conditions. The chimeric peptide Gp91ds-tat that comprises a 9-amino acid sequence of Gp91phox known to interact with p47phox, and prevents the association of p47phox to the Gp91phox membrane-bound component of NADPH oxidase. Gp91ds-tat was selected as the most potent inhibitor of Nox2 in human neutrophil cell-free assays [51] and was also described as a strong inhibitor of superoxide generation in the vascular system where Nox1 and Nox4 play a key role [51]. However, it has a poor oral bioavailability and propensity to induce immunogenic response in patients, limiting its use in the treatment of vascular disease [51]. To our knowledge, the efficiency of Gp91ds-tat was demonstrated in human [51, 92], mouse [93] and rat [94] models but never in horses.

With our validated equine cell free assay, we started the study of curcumin and resveratrol on NADPH oxidase activity, two molecules which have gained a growing interest for their anti-inflammatory activities [77, 151], and that we already studied for their potent inhibitory effect on the oxidant response of stimulated neutrophils by inhibiting the activity and the

release of MPO and by decreasing the ROS production [2, 59], as well as for the *in vivo* activity of curcumin in horse recurrent airway obstruction [4]. From these previous studies, we hypothesized that resveratrol and curcumin have an inhibitory effect on NADPH oxidase activity but we had to confirm this hypothesis and to explain the mechanism of inhibition. By chemiluminescence (CL), we showed that curcumin until 10^{-6} M is a potent inhibitor of $O_2^{\bullet-}$ production, even if it is removed from the medium before the CL measure. These results confirm that the lipophilic character of curcumin [137] enables the molecule to enter or interact with the cell membrane, as we previously demonstrated [105]. Until 10^{-5} M resveratrol also inhibited the $O_2^{\bullet-}$ production, but it lost efficiency when removed from the medium by washing before the CL measure. Compared to curcumin, it seemed that resveratrol cannot enter into PMNs or hardly bind to the cell membrane during the incubation period. Resveratrol is a lipophilic molecule [152], but it may need a longer incubation period to enter the cell, as reported by Cavallaro *et al.* (2003) who pre-incubated the cells 1h with the molecule [153] compared to only 10 min in our study. The chemiluminescence results suggest an action of curcumin and resveratrol on NADPH oxidase, but this assay does not permit to distinguish an effect on the receptors or on the pathway implied in NADPH activation from a direct effect on the enzyme. An inhibitory effect of curcumin [111] and resveratrol [154] has been described on protein kinase C (PKC), which is an activator of NADPH oxidase. In cell-free system, resveratrol was more efficient on the inhibition of $O_2^{\bullet-}$ production when it was added after the assembly of the NADPH oxidase subunits. These results suggest that resveratrol influences the activity of the enzyme after its reconstitution, but it can also act by a scavenging effect on $O_2^{\bullet-}$ [96], as the molecule was present in the medium when the reduction of cytochrome C by $O_2^{\bullet-}$ occurred. Chow *et al.* have shown that resveratrol inhibits the translocation of Rac to Gp91phox in endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoprotein (oxLDL), what could explain the results that we obtained with 10^{-4} M of resveratrol added before stimulation [143]. However, 10^{-4} M is a non-physiological concentration difficult to reach in equine PMNs since we demonstrated that resveratrol cannot cross easily their membranes. Studies demonstrated that pre-incubation of macrophages with resveratrol inhibited the expression of Nox1 mRNA induced by LPS [155]. The molecule was shown to decrease the NADPH oxidase activity in rat aortic homogenates [156], and it inhibited the NADPH oxidase activity between 10–100 μ M in macrophage homogenates [151]. Curcumin had a more intense inhibitory effect on NADPH

oxidase activity but only when it was added before the NADPH oxidase assembly, suggesting an interference of the molecule with the enzyme reconstitution. Curcumin has been described to attenuate the expression of NADPH oxidase in cardiomyocytes [157] and to inhibit ROS production by macrophages [158], but, to our knowledge, no direct effect of curcumin on NADPH oxidase has been demonstrated. The modulation of NADPH oxidase by curcumin could be explained by its incorporation into membranes what is known to affect the activity of several other membrane proteins [78]. Like resveratrol, curcumin is a potent scavenger of superoxide anion so that the inhibition of $O_2^{\bullet-}$ production that we observed can be partially due to a scavenging effect [79].

In conclusion, we established the optimal conditions for a the cell-free assay for equine neutrophil NADPH oxidase, validated it, and applied it in combination with the chemiluminescence technique on whole cells, to distinguish molecules that scavenge $O_2^{\bullet-}$ from molecules that act directly on the enzyme responsible for $O_2^{\bullet-}$ production. We demonstrated that curcumin is a better modulator of NADPH oxidase activity than resveratrol: it enters rapidly into the PMNs or interacts with their membrane, and inhibits the $O_2^{\bullet-}$ production. It acts not only as an $O_2^{\bullet-}$ scavenger but also on the assembly of NADPH oxidase subunits. Resveratrol rather acts as an $O_2^{\bullet-}$ scavenger: it cannot enter or cannot enter as easily as curcumin into the cells and, on the cell-free assay, it acts preferentially after the complex assembly. We already demonstrated that curcumin efficiently reduces PMNs influx and stimulation and MPO concentration in respiratory airway of horses suffering from recurrent airway obstruction [4]. By acting directly on NADPH oxidase and by scavenging ROS, curcumin will have a therapeutic role in the treatment of this disease, and is a good candidate for the treatment of other acute or chronic pathologies.

Article III

NDS27 combines the effect of curcumin lysinate and hydroxypropyl- β -cyclodextrin to inhibit equine PKC δ and NADPH oxidase involved in the oxidative burst of neutrophils

Sandrine Derochette, Ange Mouithys-Mickalad, Thierry Franck, Simon Collienne, Justine Ceusters, Ginette Deby-Dupont, Philippe Neven, Didier Serteyn

FEBS Open Bio 4 (2014) 1021-1029

Abstract

Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are involved in host defence against infections by the production of reactive oxygen species (ROS), but excessive PMN stimulation is associated with the development of inflammatory diseases. After appropriate stimuli, protein kinase C (PKC) triggers the assembly of NADPH oxidase (Nox2) which produces superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), from which ROS derive. The therapeutic use of polyphenols is proposed to lower ROS production by limiting Nox2 and PKC activities. The purpose of this study was to compare the antioxidant effect of NDS27 and NDS28, two water-soluble forms of curcumin lysinate respectively complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) and γ -cyclodextrin (γ -CD), on the activity of Nox2 and PKC δ , involved in the Nox2 activation pathway. Our results, showed that NDS27 is the best inhibitor for Nox2 and PKC δ . This was illustrated by the combined effect of HP β CD and curcumin lysinate: HP β CD, but not γ -CD, improved the release of curcumin lysinate and its exchange against lipid or cholesterol as demonstrated by the lipid coloration with Oil red O, the extraction of radical lipophilic probes recorded by ESR and the HPLC measurements of curcumin. HP β CD not only solubilised and transported curcumin, but also indirectly enhanced its action on both PKC and Nox2 activities. The modulatory effect of NDS27 on the Nox2 activation pathway of neutrophils may open therapeutic perspectives for the control of pathologies with excessive inflammatory reactions.

Introduction

For the destruction of pathogenic agents during phagocytosis, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) increase their molecular oxygen consumption, a process known as the "oxidative burst", to produce reactive oxygen species (ROS) [119]. During this oxidative burst, NADPH oxidase, or Nox2, a multi-component key enzyme, produces superoxide anion $O_2^{\bullet-}$, the first specie from which most of the other ROS derive. In resting cells, subunits of NADPH oxidase are spread between membrane and cytosol. Upon stimulation of appropriate receptor, such as C5a or Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP) receptor, translocation of the cytosolic Nox2 components p40phox, p47phox and p67phox to the membrane-bound flavocytochrome b_{558} (comprising gp91phox and p22phox) is induced [14]. This translocation requires, not only a conformational modification and phosphorylation of the Nox2 components, but also a complex set of protein/protein interactions [18]. The protein kinase C (PKC) family appears to play a major role in this process especially upon stimulation of PMNs by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) or fMLP [14].

Neutrophils express PKC α , β and δ that can all initiate the superoxide generation in cell-free systems. PKC δ is required after fMLP stimulation and needs phosphatidylserine and diacylglycerol but is Ca^{2+} independent unlike other PKC family members [12]. PKCs δ are primarily localised in the cytosol of unstimulated neutrophils. In response to agonist stimulation, a fraction of PKCs δ rapidly becomes membrane-associated and this change of localisation is required to activate NADPH oxidase by phosphorylation of its cytosolic and membrane subunits, especially p47phox [159, 160].

The oxidant activity of neutrophils is required for their normal microbicidal function but their excessive stimulation, as found in inflammation situations, leads to the extracellular release of ROS and oxidant enzymes such as myeloperoxidase (MPO), causing deleterious effects on neighbouring cells and tissues [23]. As in humans, uncontrolled activation of PMNs in the horse can be related to irreversible endotoxic shock [6, 142, 161]. A therapeutic goal could be to lower the oxidant activity of excessively stimulated neutrophils by modulating the activity of MPO [2] or NADPH oxidase, both responsible for ROS production. To this end,

NADPH oxidase appears as the prime target since it produces the first ROS from which the others are derived [29].

With this objective in mind, we were interested in the study of curcumin, a natural phenolic compound of turmeric (*Curcuma longa*), widely used as a food dye and flavouring [31]. Curcumin was reported to inhibit the activation of leukocytes, including PMNs [2, 75] and monocytes [126], and to have numerous other properties [31, 75, 77, 122, 123]. This wide range of biological activities, associated with a low toxicity justifies the therapeutic interest in using curcumin [75, 124]. The action of curcumin involves interactions with transcription factors, cytokines and enzymes [76, 122] and inhibition of the oxidative response by activated PMNs through the inhibition of ROS generation and scavenging [75, 111]. Curcumin can also interfere with the MPO activity [2], a major contributor to ROS production in neutrophils. However, as the insolubility of curcumin in aqueous milieu makes its use very difficult in biochemical assays, we developed two highly water-soluble salts of curcuminoid derivative, NDS27 and NDS28, complexed with *hydroxypropyl-β-cyclodextrin* (HPβCD) and *γ-cyclodextrin* (γ-CD) respectively [81]. We previously demonstrated the capacity of curcumin to inhibit the oxidative burst of neutrophil through the inhibition of MPO [2] and NADPH oxidase [95] activities. Furthermore, we have also shown that, this capacity appeared to be improved in the soluble form of curcumin lysinate via its ability to interact with membranes and to enter the cells [105]. We thus hypothesised that the cyclodextrin from NDS27, HPβCD, enhances the action of curcumin against the oxidative burst. The purpose of the present work was to determine and compare the effect of the complexes of curcumin lysinate with two different types of cyclodextrins (HPβCD and γ-CD) on the activity of NADPH oxidase and PKCδ situated just upstream in the PMN activation pathway.

Material and methods

Chemicals and reagents

Analytical grade Na, K, Ca, Mg salts, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane and Tween 20 were from Merck. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin, pepstatin, guanosine 5'-[γ-thio] triphosphate tetralithium salt (GTP-γ-S), sodium arachidonate, cytochrome C from horse heart, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH), superoxide dismutase from bovine erythrocyte (SOD), cytochalasin B, N-formyl-methionyl-

leucyl-alanine (fMLP), Oil Red O, ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), N_{α} -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride, HEPES, 5-doxy stearic acid (2-(3-carboxypropyl)-4,4-dimethyl-2-tridecyl-3-oxazolidinyloxy, free radical) and 16-doxy stearic acid (2-(14-carboxytetradecyl)-2-ethyl-4,4-dimethyl-3-oxazolidinyloxy, free radical) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Nitrotetrazolium blue chloride (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt (BCIP) were both from Fermentas (Sankt Leon-Rot, Germany) and IMDM medium, penicillin, streptomycin, amphotericin B, fetal bovine serum and Hanks' balanced salt solution (HBSS) were from Gibco-Invitrogen (Fischer Scientific, Erembodegem, Belgium). Isopropanol was purchased from VWR (Leuven, Belgium). Bovine serum albumin (BSA) was from Roche (Mannheim, Germany). NDS27, NDS28, HP β CD and γ -CD were gifts from Philippe Neven (Faculty of Pharmacy, University of Liège, Belgium). All concentrations of NDS27 and NDS28 were expressed in term of molar concentration of pure curcumin and contain a 5-fold increased concentration in HP β CD and γ -CD respectively.

Methods

Animals experiments

All the experiments were realised in accordance with the ethic committee of the Faculty of Veterinary Medicine of University of Liege (agreement number 1474). Equine neutrophils were isolated from whole blood drawn on citrate-phosphate-dextrose (PL146, Baxter Healthcare) or EDTA (Vacuette, Greiner Bio-one) from the jugular vein of healthy horses, fed and bred in identical conditions and not under medical treatment (Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium). Horses were considered as healthy if no clinical signs of acute disease were observed at the time of sampling. Each batch of neutrophils was obtained from blood drawn from one horse. Samples were collected by a qualified veterinarian from the equine clinic of University of Liège in aseptic conditions without any surgery, anaesthetic procedure or risk for the animal.

Cell culture

Human promyelocytic leukemia cells (HL-60) were obtained from the American Type Culture Collection (ACCT, USA) and cultured in IMDM medium supplemented with 20 % (v/v) fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin/streptomycin, 1.25 mg/ml amphotericin B, and 2 g/l

NaHCO₃ in 50 ml flasks at 37 °C in a 5 % CO₂ humidified atmosphere. Cells were supplied with fresh medium two to three times per week to maintain log phase growth. Once a week, the contents of culture flasks were centrifuged and the cell pellets resuspended in fresh IMDM and divided into new culture flasks. Before each experiment, cells were counted with Burker's cell (Briare, France) to reach the cell number required for the experiments.

Detection of phosphorylated PKC by western blot

Equine neutrophils (20 x 10⁶ cells) isolated as previously described [105], were resuspended in 1 ml HBSS with 10⁻⁴ M NDS27 or NDS28 or 5x10⁻⁴ M HPβCD or γ-CD. A control with HBSS alone was realised. After 30 min incubation with the appropriate treatment at 37°C, cells were activated with cytochalazine B (CB, 5 μM) for 15 min followed by another 15 min incubation with 10⁻⁸ M fMLP. The suspensions were centrifuged (10 min, 450 x g) to remove NDS27, NDS28, HPβCD or γ-CD and cells were resuspended in 3 ml of Buffer A (Hepes 10 mM, KCl 100 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3.5 mM, EGTA 12 mM, pH 7.3) [86] supplemented with a protease inhibitor cocktail (N-α-p-tosyl-L-lysine choromethyl ketone 10 mM, PMSF 1mM, leupeptin 1.8 μM, pepstatin 1.5 μM). Thereafter cells were sonicated (6 x 5 sec, 30 % amplitude, Labsonic P, Sartorius) and ultracentrifuged (1h, 165,000 x g, 4°C). The supernatant, corresponding to cytosolic proteins, and the pellet containing membrane proteins resuspended in 500 μl of Buffer A supplemented with anti-proteases cocktail, were kept for further western blotting analysis.

Protein samples (5 to 10 μg in a total volume of 10μl Buffer A) were added with 4 μl of loading buffer (Nu PAGE LDS sample buffer, Invitrogen) and 1.6 μl of reducing agent (Nu PAGE sample reducing agent, Invitrogen). Samples were denatured 10 min at 70 °C and 15 μl were loaded on a 4-12 % Bis-Tris gel (Nu PAGE, Invitrogen). After electrophoresis at 200V for 1h with MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen), the proteins were transferred to a PVDF membrane using a semi-dry electroblotter (55 min, 15V) and then blocked 30 min in Tris-buffered saline (TBS) containing Tween 20 (0.1 %) and BSA (1 %). After washing with TBST (TBS + 0.1 % Tween 20), the membranes were incubated for 1 h with p-PKC δ rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, pPKCδ ser 645-R, sc18369-R, dilution: 200x), washed once with TBST, then incubated for 30 min with anti-rabbit IgG antibodies from goat conjugated to alkaline phosphatase (Abcam, ab97048, dilution: 3000x). After three washing

steps of 5 min each with TBST and another one with TBS, the staining was achieved by using Nitro blue tetrazolium (NBT) and 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) as substrate for alkaline phosphatase. To quantify the blot, imageJ software [162] was used. The relative values were reported by mg of proteins and the ratio between p-PKC δ found in membrane and in the cytosol was calculated to evaluate the part of PKC δ that migrated to the membrane.

IC₅₀ determination of NDS27 and NDS28 on PKC δ activity

A radiometric protein kinase assay (³³PanQuinase Activity assay) made by ProQinase (Freiburg, Germany) was used for measuring the kinase activity of the PKC δ protein kinase. The kinase assay was performed in 96-well FlashPlates from PerkinElmer (Boston, MA, USA) in a 50 μ l reaction volume. The reaction cocktail was prepared in the following order: 20 μ l of assay buffer (or standard buffer), 5 μ l of ATP solution (in H₂O), 5 μ l of tested compound (NDS27 and NDS28 from 10⁻⁴ M to 3x10⁻⁹ M; HP β CD and γ -DC from 5x10⁻⁴ to 1.5x10⁻⁸ M in 10 % DMSO) and 20 μ l enzyme/substrate mix. The assay mixture contained 70 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μ M Na-orthovanadate, 1.2 mM DTT, 50 μ g/ml PEG₂₀₀₀₀, 10 μ M ATP, [γ -³³P]-ATP (approximately 6x10⁵ cpm per well), 4.5 nM recombinant PKC δ (ProQinase), 0.125 μ g/50 μ l substrate (PKC 19-31).

The reaction cocktails were incubated at 30°C for 60 min. The reaction was stopped with 50 μ l of 2 % (v/v) H₃PO₄ and the plates were washed two times with 200 μ l of 0.9 % (w/v) NaCl. Incorporation of ³³Pi was determined with a microplate scintillation counter (Microbeta, Wallac). All assays were performed with a Beckman Coulter/SAGIAN core system.

The median value of the counts obtained in absence of a protein kinase but in presence of the substrate was defined as "low control" and represented the unspecific binding of radioactivity to the plate. The median value of the counts for the protein kinase fully active without inhibitor was taken as the "high control". The difference between high and low control was taken as 100 % activity. The residual activity for each tested compound was calculated with the following formula:

$$\text{Residual Activity (\%)} = 100 \times [(\text{cpm of compound} - \text{low control}) / (\text{high control} - \text{low control})]$$

The residual activities for each concentration and the compound IC₅₀ values were calculated using Quattro Workflow V3.1.0 software (Quattro Research GmbH, Munich, Germany, www.quattro-research.com). The fitting model for IC₅₀ determinations was "Sigmoidal response (variable slope)" with parameters "top" fixed at 100 % and "bottom" at 0 %. The fitting method used was a least-square fit.

Cell-free system of oxidase activation

As previously described [95], 2 µg of crude membranes and 50 µg of cytosolic proteins were stimulated by addition of 10 µl sodium arachidonate and 2 µl of guanosine 5'-[γ-thio] triphosphate tetralithium salt (GTP-γ-S) (2 µM). A preliminary assay was performed with each batch to determine the optimal amount of sodium arachidonate to be added to provide maximal oxidase activation. The cell-free assay activation was performed in 96-well plates (microtiter assembly breakable strip, Thermo Fisher Scientific) in a total volume of 200 µl phosphate buffered saline (PBS) plus 10 mM MgSO₄. After 5 min incubation under stirring (RT, 600 rpm), 30µl cytochrome C (100 µM) were added. Reduction of cytochrome C was initiated by the addition of 10 µl NADPH (250 µM) and the increase of absorbance at 550 nm was followed with a multi-plate reader (Multiscan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific) during 5 min. For each experiment, a control supplemented with 200 U/ml superoxide dismutase (SOD), was performed in parallel to the same test without SOD (replaced by an equivalent volume of PBS+MgSO₄). The difference of absorbance between the reduction of cytochrome C in the presence and absence of SOD was used to evaluate the specific reduction of cytochrome C by O₂^{•-} generated by the oxidase activity. The O₂^{•-} concentration was calculated using Beer-Lambert law with an absorption coefficient of cytochrome C equal to 21.1 mM⁻¹cm⁻¹ at 550 nm.

In a first experimental model, the tested molecules (10⁻⁶ to 10⁻⁴ M NDS27 or NDS28 and 5x10⁻⁶ to 5x10⁻⁴ M HPβCD or γ-CD) were pre-incubated for 5 min at room temperature under stirring before the assembly of NADPH oxidase by sodium arachidonate and GTP-γ-S. Then, cytochrome C, SOD (for controls) or PBS+MgSO₄ and NADPH were added to measure the oxidase activity. In a second model, the tested molecules were added under stirring (600 rpm) after the assembly with sodium arachidonate and GTP-γ-S and, after 5 min incubation, the NADPH oxidase activity was measured as for the first model.

Measurement of lipid content by Oil Red O

Five million PMNs/ml in HBSS were incubated with 10^{-3} , 2×10^{-3} or 3×10^{-3} M NDS27 or NDS28 or with 5×10^{-3} , 10×10^{-3} or 15×10^{-3} M HP β CD or γ -CD for 2 hours at 37°C. Cells were then centrifuged (5 min, RT, 524xg) and the supernatant containing the excess of tested molecules, was discarded. The pellet was washed with 1 ml of HBSS. After the washing step, the cell pellets were separated in two parts: in the first one, 500 μ l of Oil Red O (1 % w/v diluted in a mixture of isopropanol and water 3:2) were added and in the second part, 500 μ l of isopropanol/water mixture (3:2) were added as control. After a 30-min period of incubation at 37°C, cells were washed three times with 1 ml of HBSS and resuspended in 500 μ l of HBSS. Two hundred μ l of each sample were placed in the cavities of a microplate and the absorbance was measured at 540 nm with a microplate reader (Multiskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific). Absorbance values of the control tests with isopropanol/water mixture were subtracted from absorbance values of cells coloured by Oil Red O to avoid interferences due to the natural colour of curcumin.

Electron spin resonance (ESR) experiments with 5- and 16-DSA

HL-60 cells (5×10^6 /500 μ l of HBSS) were incubated for 20 min with 5 μ l of either 5- or 16 DSA (0.01 M). The cells were then centrifuged and the pellets were resuspended in 500 μ l HBSS supplemented with either 10^{-4} M NDS27, NDS28, 5×10^{-4} M HP β CD or γ -CD and incubated for 10 min at RT. Subsequently, cells were centrifuged and the pellet (resuspended in 500 μ l of HBSS) and supernatant were transferred into separate micro-caps tubes (sealed with rubber and transferred into ESR tube), placed into the cavity of the ESR spectrometer. The ESR characteristic spectra of the 5-DSA and 16-DSA signals were recorded. The measurements were implemented at 300 K with a continuous wave spectrum EMX-micro of Bruker (Brüker, Rheinstetten, Germany), operating at fixed X-band frequency of 9.5 GHz and at a microwave power of 10.88 mW. The instrumental settings were as follows: 100 kHz modulation frequency, 2 G modulation amplitude, 3,389.698 G magnetic field center, and 3.56×10^4 receiver gain. The sweep width was 89.652 G and the total number of scans was five.

HPLC quantification of curcumin from NDS27 and NDS28 incorporated into the cells

HPLC quantification of curcumin was performed as previously described [105]. Briefly, 100×10^6 isolated PMNs were resuspended in 2 ml of PBS supplemented with NDS27 or NDS28 (10^{-4} M) and incubated 30 min at 37°C. The cells were then washed and separated into different fractions [105]. The assay of curcumin was performed by a HPLC system including a Merck Hitachi L-7100 solvent delivery system (pump) working at a flow rate of 0.7 ml/min, a Merck Hitachi L-7400 UV detector and a 7725i rheodyne injector with a loop of 20 μ l. The EZ Chrom ELITE software was used for integration. Chromatography was conducted using a Merck LichroCart 125-4 LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) column with an isocratic elution with tetrahydrofuran (THF)/ 50 mM citrate buffer (pH=6) (66:34) and detection at 419 nm using a UV detector.

Statistical analysis

Data are given in relative values (%) in reference to control groups defined as 100%. All data are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) of at least two independent experiments made with different cell batches. Statistical analysis was realised with corresponding solvent vehicle control group as reference. An independent T-test was performed with SOFA statistics 1.3.2 (Released under open source AGPL3 licence© 2009-13 Paton-Simpson & Associates Ltd). A Mann-Whitney test was realised for data that did not respect a Gaussian distribution. A p-value <0.05 was considered as significant.

Results

Effect of NDS27 and NDS28 on the phosphorylation and translocation of PKC δ

The western blot analysis showed that, in activated PMNs (C), the signal corresponding to p-PKC δ was stronger in the fraction containing the membranes compared to cytosolic fractions (Figure 45A). Upon pre-incubation of the cells with 10^{-4} M NDS27 or with 5×10^{-4} M HP β CD, we observed a reduction of the p-PKC δ content in membranes but an increase in the cytosol suggesting that NDS27 and HP β CD decreased the migration of phosphorylated PKC to the membrane and thus the enzyme activation (Figure 45A). The quantification and calculation of p-PKC δ ratio between membrane and cytosol extracts showed that NDS27 and HP β CD significantly reduced the PKC δ activation (respectively -50% and -71%, Figure 45B).

Incubation of PMNs with 10^{-4} M NDS28 or 5×10^{-4} M γ -CD slightly increased the p-PKC δ content in membrane fractions and reduced it in the cytosol (Figure 45C), resulting in a non-significant increase of the membrane/cytosol ratio (Figure 45D).

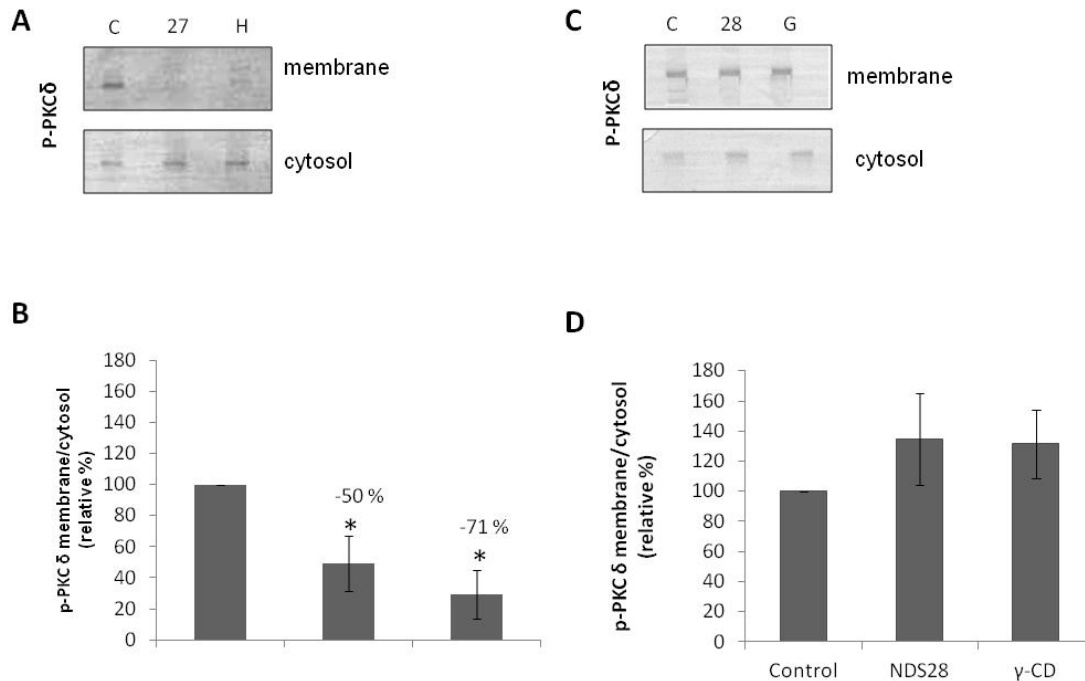


Figure 45. Detection of phosphorylated PKC δ (p-PKC δ) in cytosolic and membrane extracts from activated PMNs treated or not with NSD27, NSD28, HP β CD or γ -CD. (A) and (C): Example of western blotting. C: control cells; 27: cells treated with 10^{-4} M NDS27; H: cells treated with 5×10^{-4} M HP β CD ; 28: cells treated with 10^{-4} M NDS28; G: cells treated with 5×10^{-4} M γ -CD. (B) and (D): Quantification of pPKC detected in the cellular extracts (ImageJ software). For each condition, results are expressed as the ratio of p-PKC δ detected in membrane versus cytosolic extracts. The percentage of inhibition indicated on the top of each column is calculated versus the ratio obtained for control cells taken as 100 %. Control: control cells; NDS27: cells treated with 10^{-4} M NDS27; HP β CD: cells treated with 5×10^{-4} M HP β CD; NDS28 cells treated with 10^{-4} M NDS28; γ -CD: cells treated with 5×10^{-4} M γ -CD. * $p < 0.05$ vs control. Data are given as means \pm S.E.M. ($n \geq 4$).

Effect of NDS27 and NDS28 on PKC δ activity

The hill slopes characteristic of the curve shapes were calculated for each condition and a hill slope higher than -0.4 would mean that the curve was not sigmoidal, very flat or not descending. As observed in Figure 46A and C, the shape of the dose-response curves with NDS27 and NDS28 were sigmoidal as confirmed by the hill slopes lower than -0.4 (-1.37 and -1.23 respectively). The IC_{50} determined for the two molecules were quite similar: 1.67×10^{-5} M for NDS27 and 1.26×10^{-5} M for NDS28. For HP β CD and γ -CD the hill slopes were higher than -0.4 showing no inhibition (Figure 46B and D).

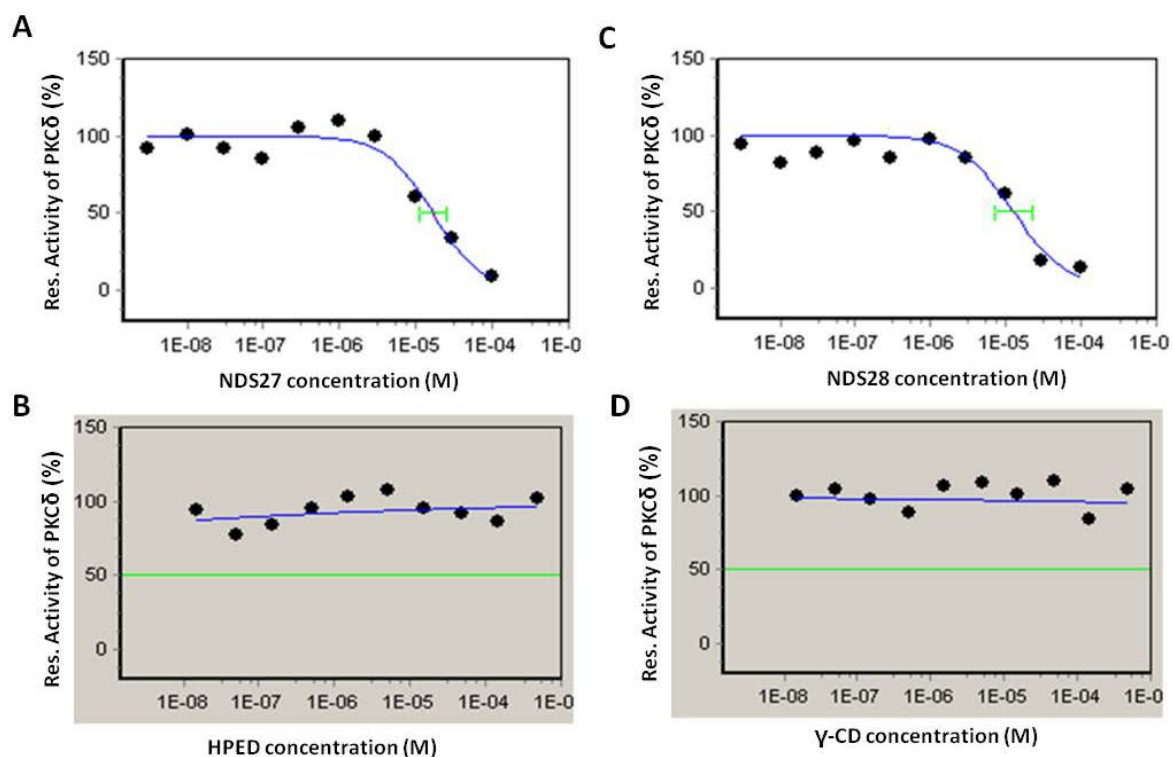


Figure 46. Effect of NDS27 (A), HPβCD (B), NDS28 (C) or γ-CD (D) concentration (black lines) on the residual activities of PKCδ (%). A horizontal light grey line shows the inflection points of the curves corresponding to the IC₅₀.

Effect of NDS27 and NDS28 on the activity of NADPH oxidase

NDS27, NDS28, HPβCD or γ-CD were added before or after NADPH oxidase activation with GTP-γ-S and sodium arachidonate. NDS27 exhibited a dose-dependent inhibitory effect on the O₂^{•-} production and this effect was more pronounced when the molecule was added before the enzyme assembly (Figure 47A). The inert vehicle substance, or excipient of NDS27, HPβCD, has a stronger inhibitory effect when added alone than in combination with curcumin salt (NDS27). Again, the effect of HPβCD was more important when it was added before the NADPH oxidase activation. NDS28 and γ-CD added before the enzyme assembly had no effect on the NADPH oxidase activity (Figure 47B). When γ-CD was added after assembly, it showed a pro-oxidant activity by increasing O₂^{•-} production, however a significant effect was only observed at 25x10⁻⁵ M.

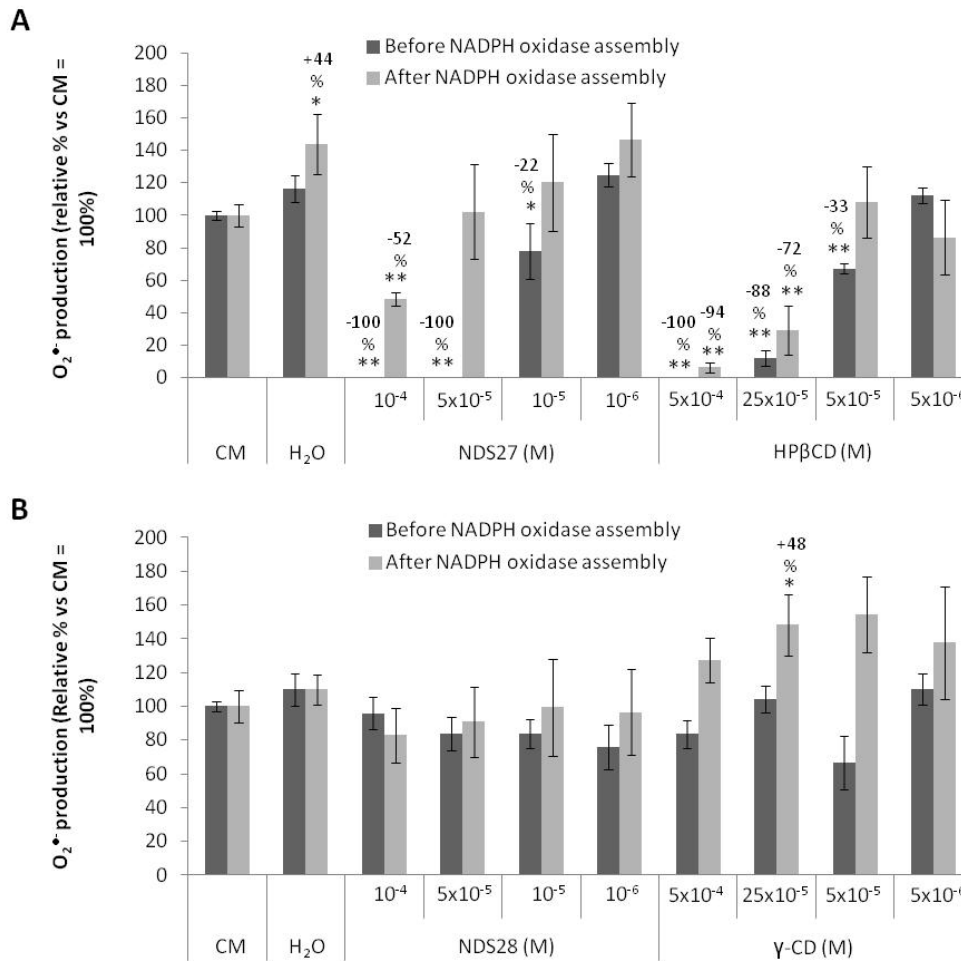


Figure 47. Effect of NDS27 and HPβCD (A) or NDS28 and γ-CD (B) on NADPH oxidase assembly and activity as determined by O₂^{•-} production in cell-free assay. The tested molecules were added before (dark grey) or after (light grey) NADPH oxidase assembly. The percentages of inhibition indicated on the top of each column were calculated versus the respective control group (CM), **p<0.001, *p<0.05. CM: reconstituted complex without the tested molecule. Data are given as means ± S.E.M (n≥6).

Influence of NDS27 and NDS28 on the lipid content of cell membranes

Pre-incubation with NDS27 (2 and 3x10⁻³ M) resulted in a significant dose-dependent reduction in the lipid content of PMNs (Figure 48A). HPβCD alone showed the same significant effect at the final corresponding concentration of 10x10⁻³ and 15x10⁻³ M but the reduction of lipid content was less important than observed with NDS27. In contrast, pre-incubation with both NDS28 and γ-CD did not affect the lipid content of the cells, except at 2x10⁻³ M, where we observed an increase of Oil Red O coloration (Figure 48B).

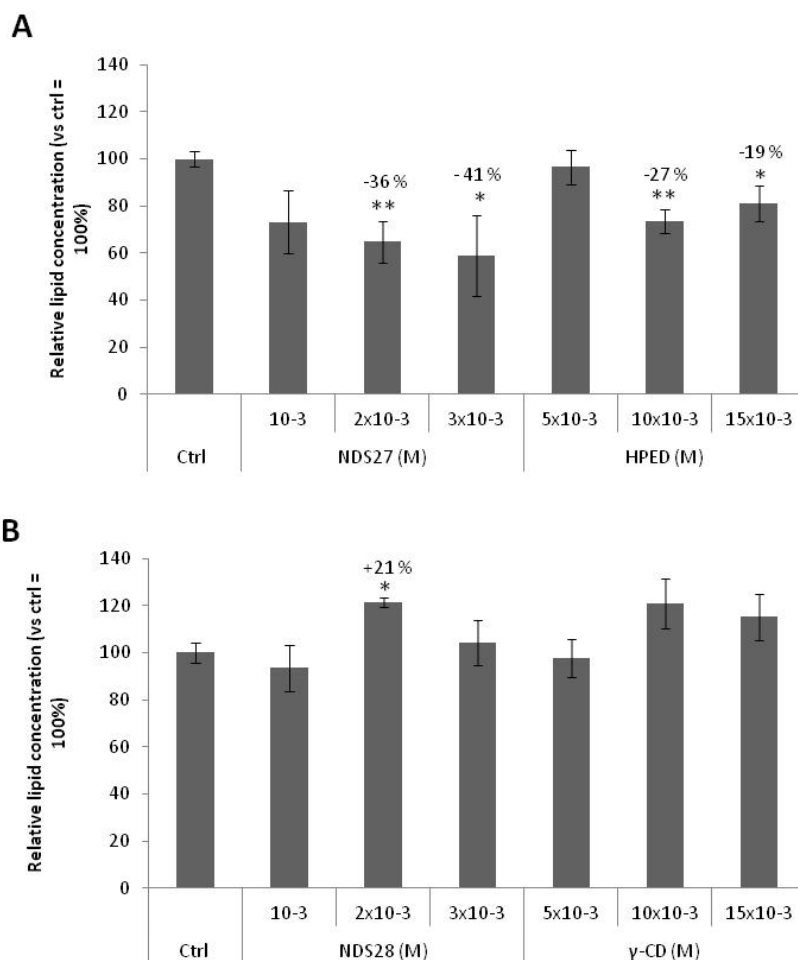


Figure 48. Effect of NDS27 and HPβCD (A) or NDS28 and γ-CD (B) on the lipid content of PMNs measured by Oil Red O coloration and compared to control cells. The percentages of inhibition indicated on the top of each column were calculated versus cells control group (Ctrl), **p<0.001, *p<0.05. Data are given as means ± S.E.M (n≥6).

Effect of NDS27 and NDS28 on 5-DSA and 16-DSA probe extraction from cell membranes

The 5-DSA and 16-DSA probes are detected by ESR spectroscopy based on their nitroxide radical located on 5th and 16th carbon, respectively. They are characterised by different lengths of the hydrophobic chain near the nitroxide radical allowing them to anchor more (16-DSA) or less (5-DSA) deeply in the membrane. The ESR spectra of both 5-DSA and 16-DSA probes, incubated with HL-60 cells (control), were quite similar for the cellular pellet and the supernatant, meaning that only a part of the probe is fixed on the cells after incubation (Figure 49A, B and Figure 50A, B). When the cells pre-incubated with 10⁻⁴ M NDS27 or 5x10⁻⁴ M HPβCD, increased ESR signal was observed for the supernatant (Figure 49A, dotted lines), which is characteristic of the ESR spectrum shape of 5-DSA free in a buffer medium. The

spectrum recorded on the pellets showed weak signals compared to control pellets (Figure 49A, plain lines) suggesting that only a small part of the probe remained in the cell membrane after NDS27 or HP β CD treatment. The quantification of the ESR signal intensity allowed us to establish the tight relationship between the presence of the drug (e.g. NDS27) within the cell membrane and the uptake of the probe (5-DSA) outside, thus increasing the signal intensity of free 5-DSA from 895 % for NDS27 versus 778 % in the presence of HP β CD (Figure 49C). We also obtained a reduction of the signal intensity for the cellular pellets: -28 % for NDS27 and -30 % for HP β CD (Figure 49C). A similar effect was observed when using the 16-DSA probe instead of the 5-DSA one. Intense signals, characteristic of the free probe, observed in the supernatant when cells were pre-incubated with NDS27 or HP β CD (Figure 49B) but the difference for both signals compared to the control was less marked than with 5-DSA. The quantification of signal intensities showed an increase of 58 and 44 % respectively in the supernatant for NDS27 and HP β CD and a reduction of 74 % (NDS27) and 77 % (HP β CD) in cellular pellets compared to control (Figure 49D). On the contrary, NDS28 and γ -CD, exhibited little influence on the uptake of 5-DSA and 16-DSA outside the cell membrane compared to control (Figure 50).

Capacity of curcumin from NDS27 and NDS28 to enter the cells

We previously published that the supernatant and the wash fractions of PMNs incubated with NDS27 contained 31.80 and 3.19 % of total curcumin respectively. After sonication and two centrifugation steps, 2.48 % of curcumin was found in the cytosol, 16.49 % in the membrane and 45.65 % in the cellular debris, consisting of granules, nuclei and unbroken cells. The total relative amount of curcumin entering the PMNs was estimated to be 64.62 % [105]. Our HPLC measurement also demonstrated that most of the curcumin from NDS28 did not enter PMNs incubated with this molecule as 84.22 % of curcumin remained in the supernatant and 1.17 % was recovered after the two washing steps. After sonication and two centrifugation steps, 1.78 % of curcumin was found in the cytosol fraction, 2.63 % in the membranes and 10.07 % in the cellular debris (Figure 51).

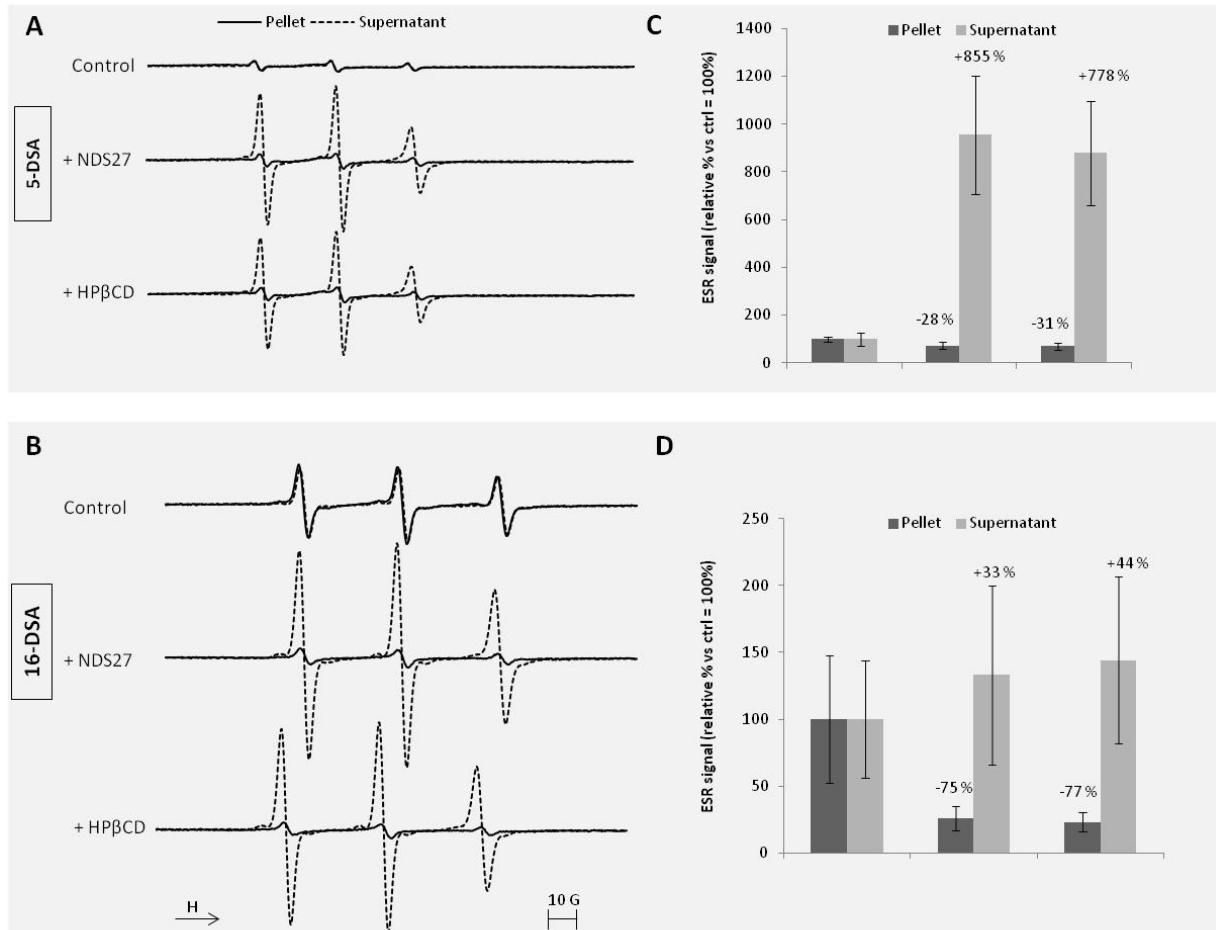


Figure 49. Example of ESR spectra obtained with 5×10^6 HL-60 cells incubated with 5-DSA (A) or 16-DSA (B) and treated with 10^{-4} M NDS27 or 5×10^{-4} M HPβCD. After cells centrifugation, the ESR spectra were recorded on the supernatant (dotted lines) and on the pellets (plain lines) reconstituted in HBSS. Reproducible results were obtained in at least three replicate experiments. The signal intensities of 3-lines ESR spectra, corresponding to 5-DSA spectra (C) or 16-DSA spectra (D) respectively, were calculated and expressed in relative percentage values versus control ones taken as 100 %. Data are given as means \pm S.E.M ($n \geq 3$).

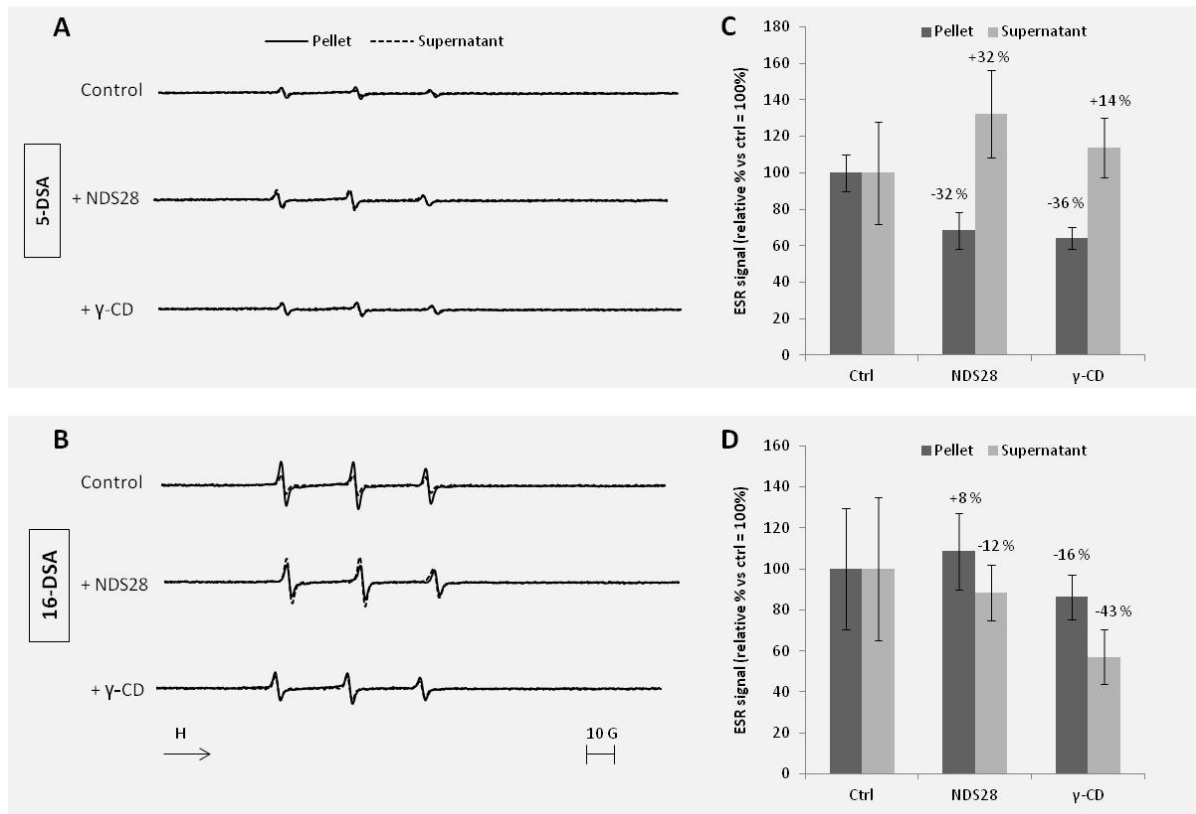


Figure 50. Example of ESR spectra obtained with 5×10^6 HL-60 cells incubated with 5-DSA (A) or 16-DSA (B) and treated with 10^{-4} M NDS28 or 5×10^{-4} M γ -CD. After cells centrifugation, the ESR spectra were recorded on supernatant (dotted lines) and on pellets (plain lines) reconstituted in HBSS. Reproducible results were obtained in at least three replicate experiments. The signal intensities of 3-lines ESR spectra, corresponding to 5-DSA spectra (C) or 16-DSA spectra (D) respectively, were calculated and expressed in relative percentage values versus control ones taken as 100 %. Data are given as means \pm S.E.M ($n \geq 3$).

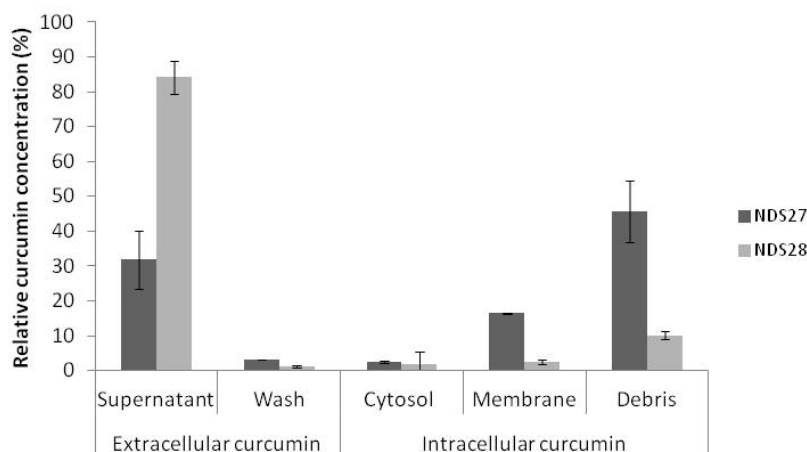


Figure 51. Quantification of curcumin from NDS27 or NDS28 (10^{-4} M) that entered or not into PMNs after incubation. Supernatant: curcumin found in the supernatant after 30 min incubation with cells. Wash: curcumin recovered after two washings of the cells. Cytosol and membrane: curcumin found in cytosolic and membrane fractions respectively after ultracentrifugation of sonicated cells. Debris: curcumin found in granules, unbroken cells and nuclei. Data are expressed in relative percentages versus the sum of the amounts of curcumin found in the different fractions taken as 100 % and are given as the mean \pm S.E.M of two (for NDS27) or six (for NDS28) separate experiments ($n \geq 2$).

Discussion

Our present findings [2] and those previously described by other groups including Nakamura et al. [163] have successfully shown the ability of curcumin to inhibit the ROS production mediated by stimulated neutrophils. More recently, our group brought further evidence that curcumin acts not only by a ROS-scavenging effect, but also by inhibiting the NADPH oxidase activity in cell-free assay [95]. However, the lack of curcumin solubility in aqueous medium combined with a poor intestinal absorption [164] may reduce its potential therapeutic effects and complicate its use for biochemical assays. For these reasons, our team has synthesised NDS27 and NDS28, two water-soluble complexes of curcumin lysinate prepared with two different cyclodextrins: 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP β CD) and γ -cyclodextrin (γ -CD), respectively. As for curcumin, both NDS27 [105] and NDS28 (unpublished results) presented great efficiency in inhibiting ROS production from activated PMNs and also led to a reduction of the activity of MPO, a strong oxidant enzyme of PMNs. However, their effects on NADPH oxidase activity, more and more considered as a target to modulate inflammatory events [29], had not yet been investigated.

In this study, we demonstrate that NDS27 behaves as a potent inhibitor of NADPH oxidase in cell-free system. The inhibitory effect was more efficient when NDS27 was added before

(significant inhibition from 10^{-5} M) than after the enzyme assembly (significant inhibition at 10^{-4} M), suggesting that NDS27 acts by inhibiting the enzyme assembly rather than by acting on its activity. These findings are in accordance with our previous results obtained with pure curcumin [95], but NDS27 exhibited greater inhibitory effect than the parent compound curcumin to reduce NADPH oxidase assembly since at 10^{-4} and 5×10^{-5} M, it totally inhibited the enzyme activity in cell-free assay while curcumin did not (about 45 % of inhibition at similar concentrations [95]). The inhibitory potential of curcumin lysinate salt in cell-free system was somewhere between that of curcumin and NDS27 (data not shown). The excipient for NDS27, HP β CD, showed more efficient inhibitory effect on the activity of NADPH oxidase than NDS27 itself, while NDS28 and its excipient, γ -CD, had no effect suggesting that the type of cyclodextrin is important for the mode of action of the soluble form of curcumin. Besides an evident effect on NADPH oxidase assembly, we have also demonstrated that NDS27 and NDS28 both act upstream in the NADPH oxidase activation pathway by inhibiting the PKC δ activity with IC₅₀ values of 1.67×10^{-5} M and 1.26×10^{-5} M, respectively, these values being much lower than the curcumin IC₅₀ value which is about 0.6 mM [111]. Although cyclodextrins had no direct effect on the activity of PKC δ , the results obtained by Western blot analysis showed that HP β CD and NDS27 had an inhibitory effect on the translocation of PKC δ , but not γ -CD and NDS28 suggesting a different behavior of the soluble molecules due to the cyclodextrin used. The difference between HP β CD and γ -CD is based on the cavity size formed by 7 or 8 dextrose units respectively. Another structural characteristic for HP β CD is that the hydroxyl group was esterified with a propyl group that improved its solubility, as compared to β -cyclodextrins [82]. β -cyclodextrins are also known to be the most effective sterol-acceptors, due to the diameter of their internal cavity which matches the size of these molecules [84]. With Oil Red O coloration, we determined the ability of NDS27, NDS28 and their respective cyclodextrins to extract the lipid content from the PMNs cell membranes. Due to the sensitivity limitation of this technique, the concentrations of the molecules were increased compared to those usually used. Our results demonstrated that HP β CD and, to a bigger extent, NDS27 were able to reduce the lipid content of the cells while NDS28 and γ -CD had almost no effect. This further underlines the important role played by cyclodextrins.

To better understand the behavior of the drugs, a set of ESR experiments were conducted, using 5-DSA and 16-DSA probes which have a poor solubility in water and tend to localise in the hydrophobic parts of complex systems [115]. The main idea was first to investigate whether or not incubation of NDS27, or its analog NDS28, influences the membrane fluidity. Furthermore, we also wanted to understand the mechanism of exchange between the drugs and membrane and how it could influence the shape and intensity of ESR signals. According to the ESR data obtained on the HL-60 cellular model, we did not observe any changes in membrane fluidity. However, the binding of both 5- and 16-DSA at the membrane surface, indicated by ESR spectra obtained on pellets from cells pre-incubated with the probes, allows us to successfully demonstrate the capacity of NDS27 and HP β CD to interact with the probes. Our ESR results are clearly in accordance with Oil Red O experiments and indicate that NDS27 and HP β CD readily extracted probes from membranes to the supernatant with a better effect on the 5-DSA than the 16-DSA which is more deeply anchored in the membrane. On the contrary, the use of NDS28 and γ -CD, led to weak ESR signals in supernatants showing their low potential to extract the probes from membranes.

The latter results could be extended to the action of these molecules on the enzymes activity. Undoubtedly, a modification of the lipid environment by NDS27 could be responsible for NADPH oxidase and PKC δ inhibitions. Curcumin may also play a role in this modification as it can bind to the membrane in a surface-associated mode at low concentrations and a trans-membrane mode at higher concentrations [165]. In this case, the drug is anchored to the bilayer by a hydrogen bond near the phosphate group of phospholipids in a manner somewhat similar to cholesterol [165]. We have previously demonstrated that curcumin from NDS27 is easily incorporated into PMNs [105], but NDS28 remained to be tested. By HPLC analyses, we determined that curcumin from NDS28 remained in great part in the extracellular medium (85 %) while 65 % of curcumin from NDS27 was found within the cells [105]. These results suggest that HP β CD easily exchanges curcumin lysinate for lipid components while γ -CD does not, making HP β CD a better drug delivery agent for curcumin lysinate salt. Moreover, HP β CD has been previously used in complexation with other flavonoids to solubilise and increase their antioxidant capacities by protecting molecules from oxidation by radical species [166]. Yancey et al. (1996) suggested that HP β CD is able to diffuse into the proximity of the plasma membrane, meaning that

cholesterol molecules could enter directly into the hydrophobic pocket of the cyclodextrin without the necessity of completely desorbing through the aqueous phase [167]. While the suitability of β -CD and its derivatives to interact with the phospholipids is questioned, the potency of β -CD to preferentially extract cholesterol from cell membranes is broadly recognised [138]. NDS27 appeared to perform more efficiently in the extraction of lipid molecules than HP β CD alone. Owing to the incorporation of curcumin in the apolar cavity of HP β CD, a direct exchange of curcumin for cholesterol could occur. On the contrary, HP β CD will first fill its apolar cavity with water molecules that will be subsequently exchanged for cholesterol [83]. The alteration of lipid distribution by curcumin lysinate [78, 116] and HP β CD [168] can affect the activity of membrane proteins and the cell signaling through the alteration of lipid raft systems (cholesterol-rich, detergent insoluble compartment membranes) which participate in the signal transduction mechanism [31]. A recent study by Tsukamoto and co-workers [169] showed that curcumin, at very low concentration, modulates the lipid raft domains by localising between the liquid ordered (l_o) raft and the surrounding liquid disordered (l_d) phase causing a domain fusion process. In neutrophils, Fc γ RIIIB receptors, associated with lipid raft by a glycosphosphatidylinositol (GPI) anchor, are implied in the oxidase activation. Upon stimulation, PKC δ and cytosolic components of NADPH oxidase are recruited to these microdomains and PKC phosphorylates p47phox inducing its conformational change and its interaction with the flavocytochrome b_{558} [117, 118]. A final possible mechanism to explain the inhibition of NADPH oxidase activity by the action of curcumin on PKC (Ca^{2+} dependent or not) activation, is its interaction with the Ca^{2+} binding domain and with a stimulatory site located in the kinase domain of the enzyme [170].

In conclusion, our results indicate that both soluble forms of curcumin lysinate have similar effects on the neutrophils' MPO and ROS scavenging activities. But, depending on the cyclodextrin used, NDS27 and NDS28 have a totally different behavior regarding NADPH oxidase and PKC δ , two enzymes whose activities are strongly linked to lipid rafts. The choice of cyclodextrin vehicle for curcumin lysinate seems essential to preserve and improve the capacity of the salt to interact with membranes, disturb lipid raft domains and enter into the cytosol, and thus to disrupt the pathways involved in the NADPH oxidase activation and the ROS production. Our study demonstrates that NDS27, together with HP β CD, is a better candidate than NDS28 with γ -CD for the modulation of excessive activation of PMNs. These findings may open up therapeutic perspectives to control equine or human pathologies with excessive inflammatory reactions as already demonstrated *in vivo* in horses [4].

Article IV

EquiNox2: a new method to measure NADPH oxidase activity and to study effect of inhibitors and their interactions with the enzyme

Sandrine Derochette, Didier Sertheyn, Ange Mouithys-Mickalad, Justine Ceusters, Ginette Deby-Dupont, Philippe Neven, Thierry Franck

Talanta, Under review.

Abstract

Excessive neutrophil stimulation and reactive oxygen species (ROS) production are involved in numerous human or horse pathologies. The modulation of the neutrophil NADPH oxidase (Nox2) has a great therapeutic potential since this enzyme produces superoxide anion whose most of the other ROS derive. The measurement of Nox2 activity by cell-free systems is often used to test potential inhibitors of the enzyme. A major drawback of this technique is the possible interferences between inhibitors and the probe, ferricytochrome C, used to measure the activity. We designed the "EquiNox2", a new pharmacological tool, to determine the direct interaction of potential inhibitors with equine Nox2 and their effect on the enzyme activity or assembly. This method consists in binding the flavocytochrome b₅₅₈ or the entire Nox2 onto the wells of a microplate followed by incubation with potential inhibitors or drugs. After incubation, the excess of the drug is simply eliminated or washed prior measuring the activity of the reconstituted complex. This latter step avoid the risk of interference between the inhibitor and the revelation solution and can distinguish if inhibitors, strongly bound or not, could interfere with the assembly of the enzymatic complex or with its activity. The EquiNox2 was validated using diphenyliodonium chloride and Gp91-ds-tat, two well-known inhibitors largely described for human NADPH oxidase. The present technique was used to study and understand better the effect of curcumin and its water-soluble derivative, NDS27, on the assembly and activity of Nox2. We demonstrated that curcumin and NDS27 can strongly bind to the enzyme and prevents its assembly making these molecules good candidates for the treatment of horse or human pathologies implying an excessive activation of neutrophils.

Introduction

A number of inflammatory diseases [171, 172] are due to a disturbance of homeostasis and an increased level of reactive oxygen species (ROS) partly linked to an increase activity of the enzymes involved in their formation such as NADPH oxidase (Nox) [28, 171]. Nox were primarily found into neutrophils (PMNs) but other non-phagocytic NADPH oxidases were also found into different cells and tissues [29]. The neutrophil NADPH oxidase called Nox2 is a multi-component enzyme including cytosolic and membrane subunits. Upon stimulation, the translocation of the cytosolic components (p40phox, p47phox, p67phox and Rac) to the membrane-bound flavocytochrome b_{558} (gp91phox and p22phox) is induced. This translocation requires a conformational modification of the components and a complex set of protein/protein interactions [18] necessary for the activity of NADPH oxidase. Nox2 produces $O_2^{\bullet-}$ from which other ROS are derived such as hydrogen peroxide, oxidising halogen compounds (i.e. HOCl) and free radicals, all participating in the host defense by killing invading microbes [29]. In some pathological conditions of acute or chronic inflammation, the uncontrolled activation of PMNs is responsible for ROS releases in the extracellular medium causing deleterious effects on neighbouring cells. Unlike other species, horses are particularly sensitive to inflammation [67] and suffer from inflammatory pathologies such as laminitis, recurrent airway obstruction or intestinal strangulation that are often associated with an endotoxic shock [6, 142]. Several research groups highlighted the PMNs implication in these pathologies, with a release of inflammatory mediators, myeloperoxidase, proteases, ROS,... It appears that the modulation of enzymes involved in neutrophil stimulation and ROS production such as Nox2 becomes therapeutic targets to treat pathologies with excessive inflammation [18, 29, 69]. There are several techniques for studying the activity of Nox2 on isolated neutrophils by measuring the extracellular formation of superoxide anion; one of these are the cell-free systems (CFS) consisting of the *in vitro* assembly of Nox2 subunits extracted from non stimulated PMNs followed by the Nox activity measurement. Such techniques are widely used to study NADPH oxidase [45] and to test potential inhibitors on the activity or assembly of the enzyme [95, 113] but with major drawbacks because the tested molecules cannot be removed from the medium before the measurement of the activity. This implies possible interferences between the tested molecule and the probe used for the activity measurement (i.e. lucigenin, ferricytochrome C), and we cannot exclude a scavenging effect of the molecule on $O_2^{\bullet-}$.

Based on our CFS for equine Nox2 [95], we designed the "EquiNox2", a new pharmacological tool, to determine the direct interactions of potential inhibitors with equine Nox2 and their effects on the enzyme activity or assembly. The method consists in the fixation of the flavocytochrome b₅₅₈ or the entire *in vitro* reconstituted complex on a solid support what allows the incubation of the tested molecules and their washing before the measurement of the activity. The washing steps are necessary for avoiding interferences between the molecule being investigated and the revelation system. Our newly developed method contributes also to evidence interactions between the molecules and flavocytochrome b₅₅₈ or the entire Nox2. We described here the development and optimization of the EquiNox2 method and its first application as pharmacological tool.

Material and methods

Chemicals and reagents

Analytical grade Na, K, Ca and Mg salts, dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol (CH₃CH₂OH), acetic acid and sucrose were from Merck. Dextran, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), leupeptine, guanosine 5'-[γ-thio] triphosphate tetralithium salt (GTP-γ-S), sodium arachidonate (AA), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH), superoxide dismutase from bovine erythrocyte (SOD), diphenyliodonium chloride (DPI) were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem, Belgium). Trypan blue was from ICN Biomedicals, Inc (Ohio, USA). Gp91ds-tat was from Eurogentec (Seraing, Belgium). Ficoll 400 was purchased from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Sodium dithionite was from Oroboros (Innsbruck, Austria) and L-012 from Wako Pure Chemical Industries (Japan). NDS27, (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (HPβCD) and curcumin were gifts from Philippe Neven (Faculty of Pharmacy, University of Liège, Belgium).

Methods

Equine blood sampling

All the blood samplings were realised in accordance with the ethic committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Liege (agreement number 1474). Blood was drawn on citrate-phosphate-dextrose (PL146, Baxter Healthcare) from the jugular vein of healthy horses, fed and bred in identical conditions and not under medical treatment (Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Belgium). Horses were considered as

healthy if no clinical signs of acute disease were observed at the time of sampling. Each batch for neutrophils isolation was 450 ml of blood drawn from one horse. The sampling was made by a qualified Veterinarian from the equine clinic of the University of Liège in aseptic conditions without any surgery or anaesthetic procedure and without any risk for the animal.

Isolation of equine neutrophils

The neutrophils were isolated at room temperature (18-22°C) by two steps of sedimentation: sedimentation on dextran followed by differential sedimentation on Hypaque-Ficoll as described by Nauseef (2007) [147]. The polymorphonuclear fraction was gently collected and washed in two volumes of physiological saline solution. The cell pellets were suspended in sonication buffer [20 mM phosphate buffer, pH 7.4, supplemented with 340 mM sucrose, 7 mM MgSO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50 µM leupeptine]. The cell preparation was ≥ 90 % neutrophils with a viability of 95 % as measured by the Trypan blue exclusion test [128]. The cells were used immediately after isolation and each experiment was repeated at least twice with different cell batches from different horses.

Preparation of cytosol and membrane fractions from neutrophils

Neutrophils were sonicated 3 x 10 sec with an amplitude of 30 % (Labsonic P, Sartorius) and the homogenate was centrifuged 10 min at 10,000xg (4°C). The sediment consisting of unbroken cells, granules and nuclei was discarded, and the supernatant was centrifuged at 165,000xg for 1h (4°C). Pellets containing membranes were resuspended in 3 mL of sonication buffer and frozen at -80°C for storage. The supernatant containing cytosolic proteins was also stored at -80°C. Before freezing, the protein contents were determined by the bicinchoninic acid method [148] with bovine serum albumin as standard.

Determination of cytochrome b₅₅₈ concentration

Differential absorption spectra were performed to quantify cytochrome b₅₅₈ content in the membrane extracts. Spectra were recorded with a diode array spectrophotometer (Hewlett Packard 8453) in 100 µL quartz cuvette of (Macro-Cell QS 10.00 mm). Spectrum of native oxidized cytochrome b₅₅₈ was recorded between 400 to 650 nm. Then the cytochrome was reduced by the addition of few grains of sodium dithionite and a spectrum was recorded again at the same wavelengths. The difference between the two spectra was calculated and

showed two major peaks at 426 and 558 nm and a little one at 530 nm. The Beer-Lambert law was used to calculate the heme concentration: the extinction molar coefficient at 426 nm (ϵ_{426}) is $106 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Since the cytochrome b_{558} contains two hemes, the calculated value was multiplied per two to determine the real concentration. The CL values expressed in mV were reported by the cytochrome concentration used.

EquiNox2 oxidase activity measurement

Optimisation of the technique

As illustrated in Figure 52A, membrane fractions (1.5-4.5 μg) diluted in 100 μl of PBS + 10 mM MgSO_4 were coated in 96-wells white plates (Nunc, Maxisorp Thermo Fisher Scientific) by an incubation of 1h to over night at 4, 20 or 37°C. Then the wells were emptied and washed (0, 1, 2 or 3 times with 100 μl of PBS + 10 mM MgSO_4). The cytosolic proteins were added keeping a cytosol/membrane ratio of 25, determined as optimal in previous experiments [95], and the complex assembly was stimulated by the addition of 10 μl sodium arachidonate (AA) (0-120 μM) and 2 μl of guanosine 5'-[γ -thio] triphosphate tetralithium salt (GTP- γ -S) (0-40 μM), during 30 min, under stirring (600 rpm), at room temperature. Again, the wells were emptied and the revelation was achieved by the addition of 170 μl of PBS + 10 mM MgSO_4 , 20 μl L-012 (1.2 mg/ml in distilled water) and just after the addition of 10 μl NADPH (238 μM) the chemiluminescence response was followed with a multi-plate reader (Fluoroscan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 37 °C.

In a second model (Figure 52B), the entire complex reconstituted *in vitro* as described for CFS [95] was coated on 96-well microplates. The same concentrations of cytosolic and membrane proteins previously used were stimulated with GTP- γ -S (0-40 μM) and AA (0-120 μM) for 30 min, under stirring (600 rpm) at RT. The plate was then incubated for 1h to over night at 4, 20 or 37°C to allow the fixation of the Nox2 complex. Then the wells were emptied without or with a washing step (1, 2 or 3 times with 100 μl of PBS + 10 mM MgSO_4) and the revelation was achieved as previously described.

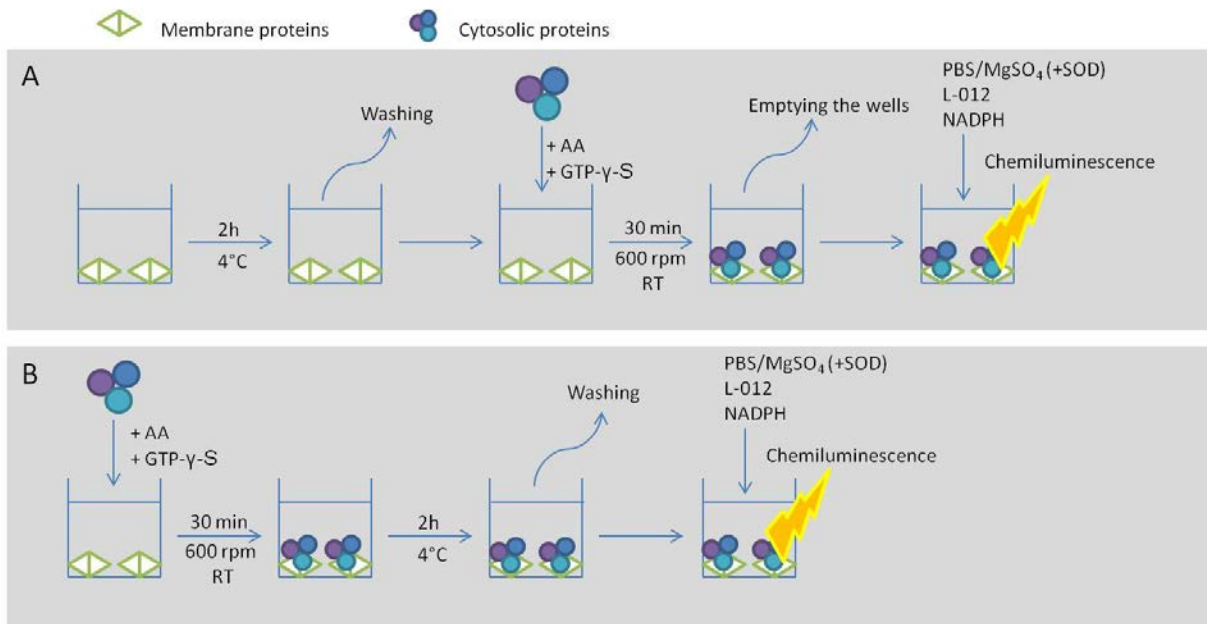


Figure 52. General scheme of the EquiNox2 technique to measure NADPH oxidase activity. (A) Membrane proteins are fixed onto the wells of a microplate for 2h at 4°C, then the supernatant is eliminated by washing steps and the cytosolic proteins are added with the activators : sodium arachidonate (AA) and guanosine 5'-[γ-thio] triphosphate tetralithium salt (GTP-γ-S). The assembly of the complex is favoured by stirring the plate for 30 min and then the unbound complexes are eliminated by emptying the wells. The enzymatic activity is measured with L-012, NADPH and SOD (or PBS+MgSO₄). (B) Membranes, cytosolic proteins are loaded onto the wells of a microplate and the assembly of the complex is stimulated with AA and GTP-γ-S by stirring the plate for 30 min. The whole complexes are bound by incubating the plate for 2h at 4°C. Then the supernatant is eliminated by washing steps and the enzymatic activity is measured by the addition of L-012 and NADPH in the presence or not of SOD (or PBS+MgSO₄).

Validation of the EquiNox2 technique

The specificity of EquiNox2 was established with increasing concentrations of SOD to inhibit the reaction due to O₂^{•-} production and with two well-known inhibitors of Nox2, DPI and Gp91-ds-tat.

For SOD, in each assay, a control test was performed on the microplate with 0-300 U/ml of superoxide dismutase (SOD) added together with the L-012 and NADPH solutions. The difference in the chemiluminescence response obtained between the test performed with and without SOD corresponds to the specific excitation of L-012 by O₂^{•-} generated by the oxidase activity.

DPI and Gp91ds-tat were used at the concentrations of 10⁻⁴ to 10⁻⁶ M and 1 to 50 μM respectively. In a first experimental condition, three washing steps were done after the binding of the membrane or the complex and DPI or Gp91-ds-tat was incubated 15 min and

then simply eliminated without washing before starting the activity assay. In a second experimental condition, after the binding of the membrane or complex, the excess of the sample was simply eliminated without washing and DPI or Gp91-ds-tat was incubated 15 min and then eliminated by three washing steps before starting the activity assay.

EquiNox2 : a pharmacological tool

EquiNox2 was used as a pharmacological tool to study molecules that could inhibit the enzymatic complex and a first application was to study the effect of two molecules on the complex assembly. The tested molecules were curcumin and NDS27, a soluble form of curcumin lysinate obtained by its complexation with (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HP β CD) [81], as we have previously demonstrated that these two compounds interfere with the enzyme assembly in cell-free system [95, 113]. In this case, the tested molecules were incubated with the coated membranes for 15 min, under stirring (100 rpm, 4°C). Then, the excess of the molecules was simply eliminated by emptying the wells or more intensively eliminated by three washing steps before the addition of the cytosolic fraction and the stimulation of the complex assembly. The revelation was achieved by the addition of NADPH and L-012 allowing the measurement of the oxidase activity (following Figure 52A).

Controls with and without solvent used to dissolve the molecules (DMSO for curcumin and H₂O for NDS27) were also performed. As there was no significant difference between the responses obtained in the presence and absence of the solvent, only the solvent controls were represented on the graphs.

Statistical analysis

Data are given in relative values (%) in reference to the activated control group (A) or the vehicle control groups consisting of reconstituted complex incubated with the solvent used to dissolve the tested molecule (ex: ethanol, water,...) and defined as 100 %. All data are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M) of at least two independent experiments made with different cell batches and carried out at least in duplicate. Statistical analysis was performed with corresponding solvent vehicle control groups as reference. An ANOVA Dunnett Multiple Comparison Test was performed with GraphPad InStat. A Kluskal Wallis Dunn's Multiple Comparison Test was realised for data that did not respect a Gaussian distribution. A p-value <0.05 was considered as significant.

Results

Choice of the probe for the EquiNox2 activity measurement

The reference method to measure the activity of NADPH oxidase in cell-free systems is based on the reduction of cytochrome C [85-87] allowing the quantification of $O_2^{\bullet-}$ with a 1:1 stoichiometric ratio [36]. However the poor sensitivity of this technique [36] did not allow to detect Nox2 activity with our new EquiNox2 method. Besides, some molecules such as H_2O_2 [36] or quercetin, a potential Nox2 inhibitors (personal observations), can interfere with the probe at high concentrations. We have therefore chosen to work with the L-012 chemiluminescent probe, which has a higher sensitivity than luminol or lucigenin to measure the production of superoxide anion [173].

Optimization of membrane proteins or entire complex binding conditions

Membrane and cytosolic protein concentrations were progressively increased keeping a cytosolic protein concentration 25 fold higher than for membranes as previously determined for cell free system [95]. Figure 53A shows that the CL response increased with the growing protein concentrations to reach a maximum at 3.5 μ g of membranes and 87.5 μ g of cytosolic proteins as well when the membranes (dark grey) or the complex (light grey) were fixed. For higher concentrations, the Nox2 activity decreased. The optimal volume for the protein binding onto the wells was 100 μ l (Figure 53B), as the CL response was higher with this volume compared to the other volumes (50 μ l and 200 μ l). The incubation temperature strongly influenced the binding of the proteins and thus the NADPH oxidase activity. We determined that 4°C was the best incubation temperature, in comparison to 37°C or 20°C, for fixing membranes or complex onto the wells, and that the best Nox2 activity was obtained for 1,2 and 4 hours incubation (Figure 53C), with a maximal response after two hours. The overnight incubation at 4°C drastically decreased the activity.

In summarise, our investigations led us to adopt 3.5 μ g for membrane proteins and 87.5 μ g for cytosol proteins in 100 μ L of final volume with an incubation for 2h at 4°C to afford the best Nox2 activity as evidenced by L-012-enhanced CL assay.

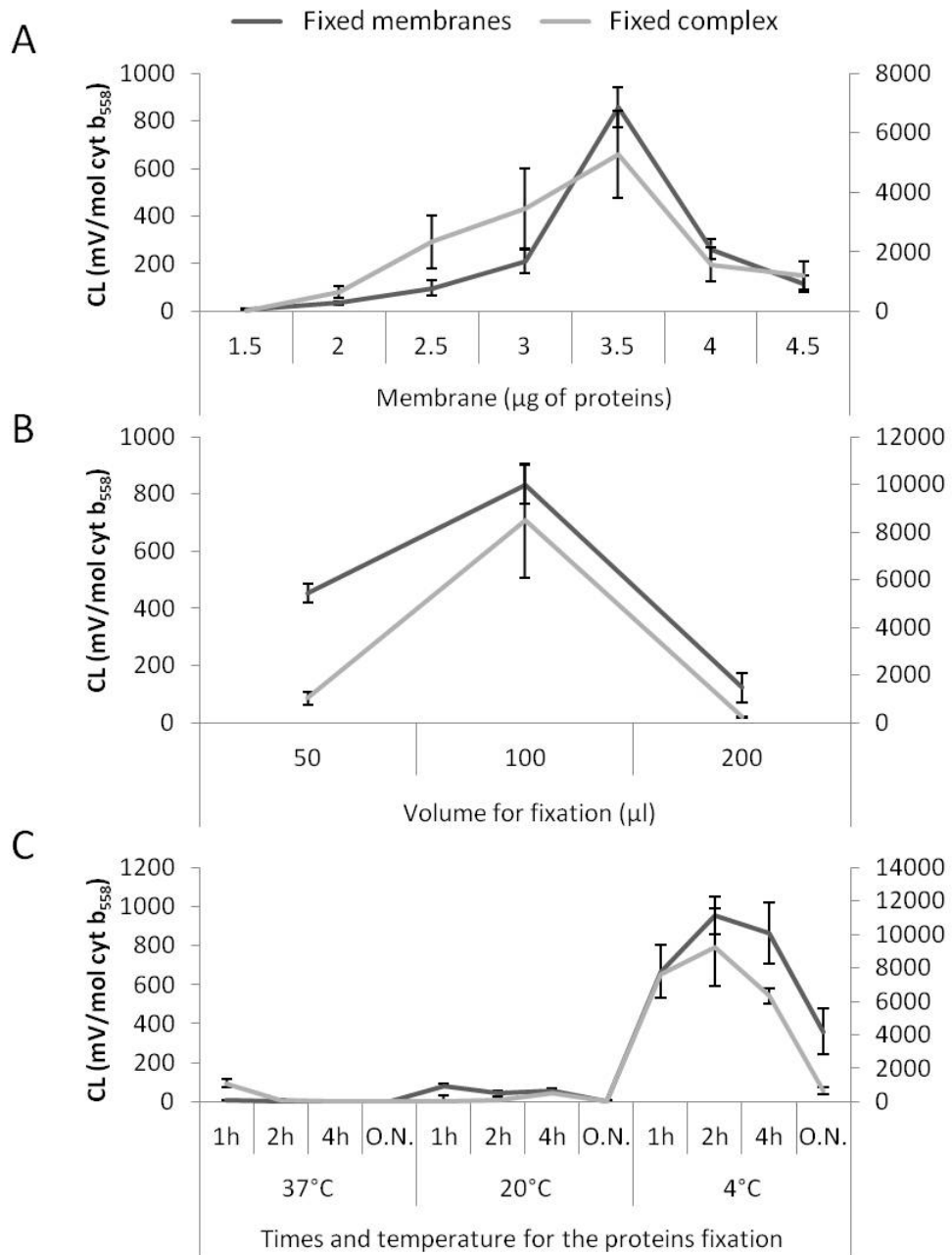


Figure 53. Dependence of the NADPH oxidase activity measured by EquiNox2 related to the amount of fixed membrane proteins (A), the sample volume (B) or the time and temperature for the binding of the proteins onto the wells (C). Dark grey left scale: the membranes were fixed onto the wells followed by the *in vitro* reconstitution of the enzyme. Light grey right scale: the *in vitro* reconstituted complexes were fixed onto the wells. O.N. : Over night. Data are given as mean \pm S.E.M. (n \geq 3)

Optimisation of activators for *in vitro* reconstitution of NADPH oxidase

We used two different cell batches to determine the optimal concentration of Nox2 activators, sodium arachidonate and GTP- γ -S, to reach the maximal production of $O_2^{\bullet-}$ and the highest CL response for the EquiNox2 assay. The experiments showed that, for the same batch, it is necessary to add a twofold higher concentration of AA for EquiNox2 assay than for CFS (data not shown). A rise of GTP- γ -S concentration until 4 μ M resulted in an increase of the CL response evidenced by the EquiNox2 method for both membranes and complex bound to the plate (Figure 54).

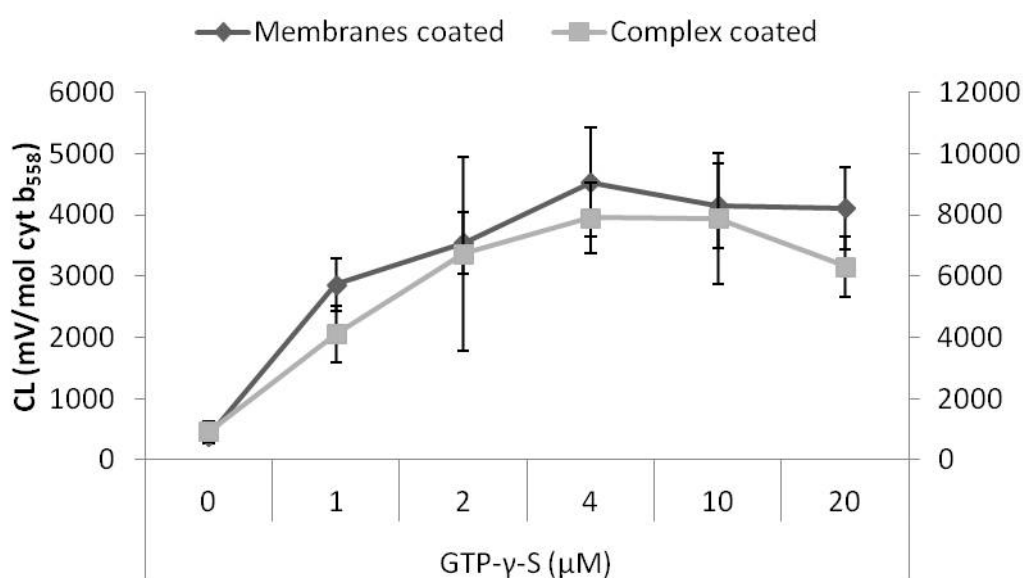


Figure 54. Activity of NADPH oxidase measured by EquiNox2 related to the GTP- γ -S concentration (0-20 μ M) added to the membranes (dark grey, left scale) or entire complex (light grey, right scale). Data are given as mean \pm S.E.M (n \geq 6).

Effect of washing steps on the measurement of NADPH oxidase activity by EquiNox2

The Nox2 activity slightly decreased with the number of washes, when the washings were realised after the fixation of membranes (Figure 55, dark grey) or complex (Figure 55, light grey). However, whatever the number of washings, this decrease appears not significant. We decided to work with three washing steps either after the coating steps (membrane and complex) or after the incubation with the tested molecules.

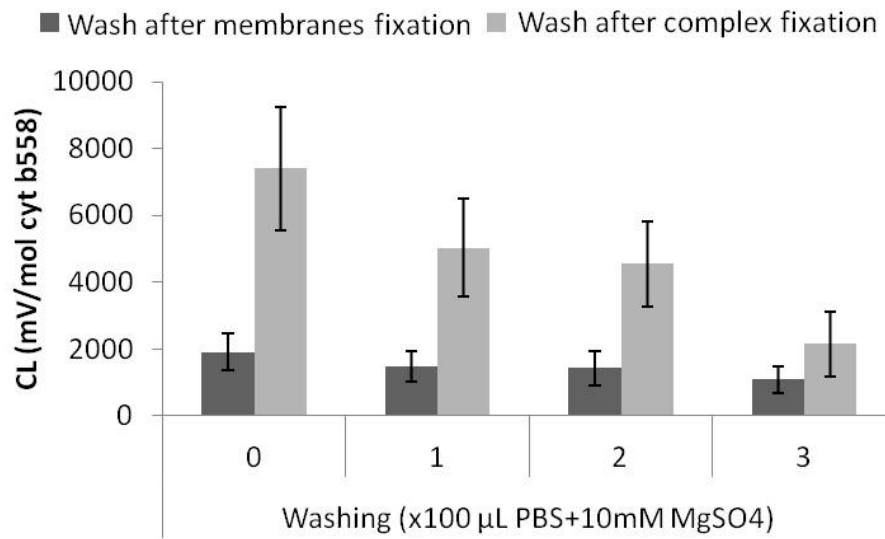


Figure 55. Activity of NADPH oxidase measured by EquiNox2 method in function of the number of washing (0, 1, 2 or 3) realised after fixation of membranes or reconstituted complex. Data are given as mean \pm S.E.M. ($n \geq 7$).

Validation of EquiNox2 method

Effect of SOD

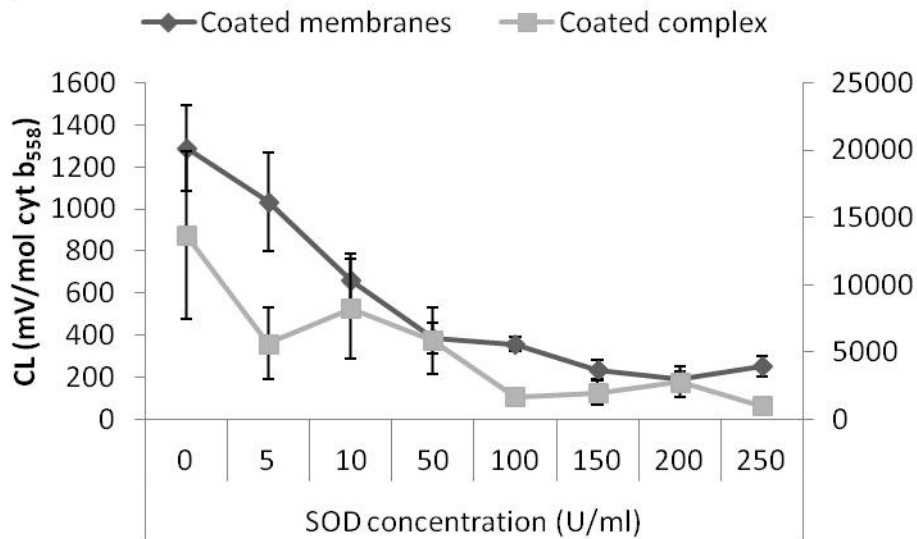


Figure 56. Activity of NADPH oxidase measured by EquiNox2 method in function of the SOD concentration (0-250 U/ml) added after fixation of membranes (dark grey, left scale) or entire complex (light grey, right scale) onto the wells. Data are given as mean \pm S.E.M. ($n \geq 5$).

The Nox2 activity decreases in relation with increasing concentrations of SOD to reach a plateau starting at 50 U/ml (Figure 56) for both the coated membranes and complex. The residual activity observed over 50 U/ml is not due to the reaction between L-012 and O_2^{\bullet} .

Effects of diphenyliodonium chloride (DPI) and Gp91-ds-tat

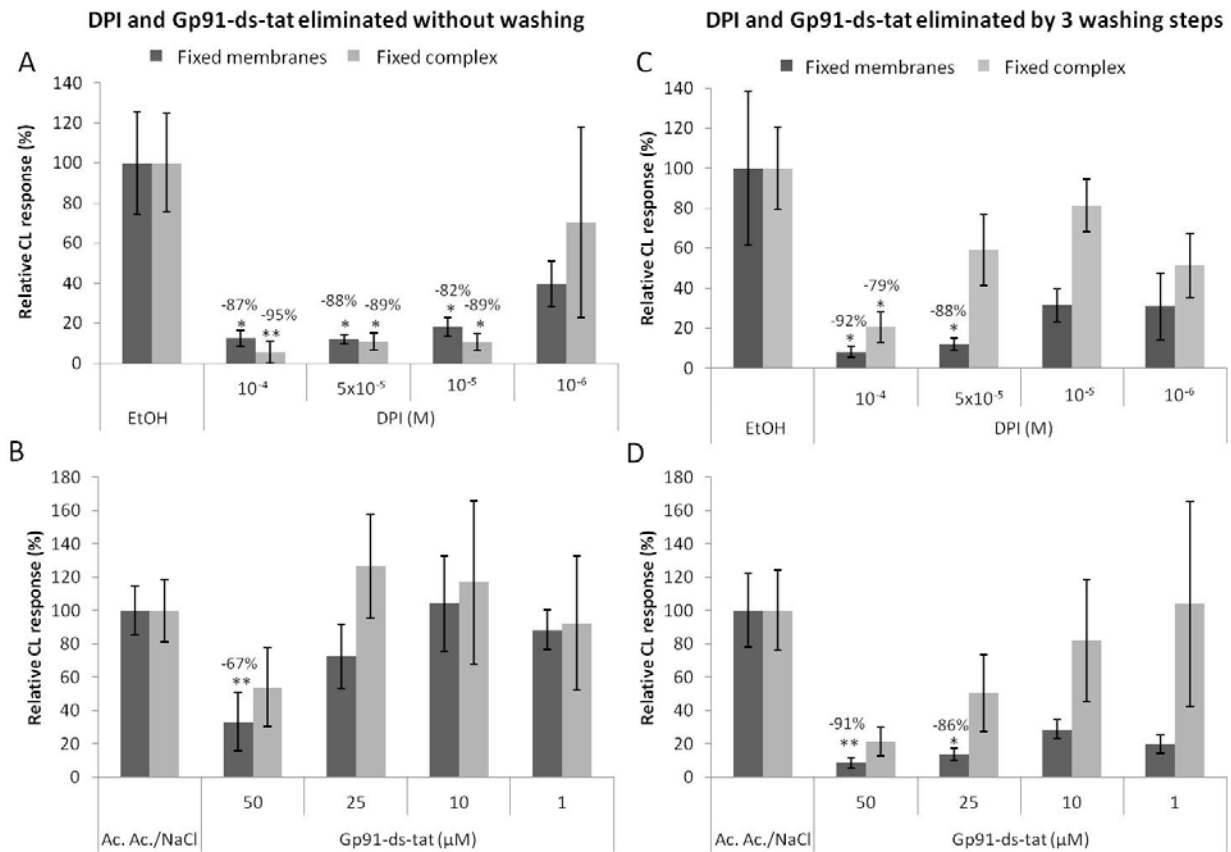


Figure 57. Effect of DPI and Gp91-ds-tat on NADPH oxidase activity measured by EquiNox2 method. DPI (10^{-6} to 10^{-4} M) and Gp91-ds-tat (1 to 50 μ M) were simply eliminated by emptying the wells (A, B) or more intensively eliminated by 3 washing steps (C, D) to evaluate the bond strength between the molecule and the enzyme. The percentages of inhibition indicated above each column were calculated *versus* the ethanol (EtOH) used as vehicle control for DPI and the acetic acid/NaCl solution (Ac.Ac./NaCl) vehicle control for Gp91-ds-tat. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Data are given as mean \pm S.E.M. ($n \geq 6$).

When DPI was incubated with washed membranes or complex and then eliminated by emptying the well (Figure 57A), it significantly inhibited, until 10^{-5} M, the activity of NADPH oxidase measured by EquiNox2 both with coated membranes (-82 %) or complex (-89 %). However, when DPI was eliminated by washing steps (Figure 57C), it caused a weaker effect than in the previous example and that was only significant until 5×10^{-5} M for fixed membranes (-88 %) or at 10^{-4} M for coated complex (-79 %). When Gp91-ds-tat was incubated with washed membranes or complex and then eliminated by emptying the well (Figure 57B), it reduced the activity of NADPH oxidase measured by EquiNox2 but only at 50 μ M with fixed membranes (-67 %). A significant inhibition of Gp91-ds-tat was also observed

at 50 μM (-91 %) and 25 μM (-86 %) when the washes were done after the incubation with the molecule (Figure 57D). Gp91-ds-tat did not have any effect on the bound complex.

Preliminary study of curcumin and NDS27 using EquiNox2 with fixed membranes

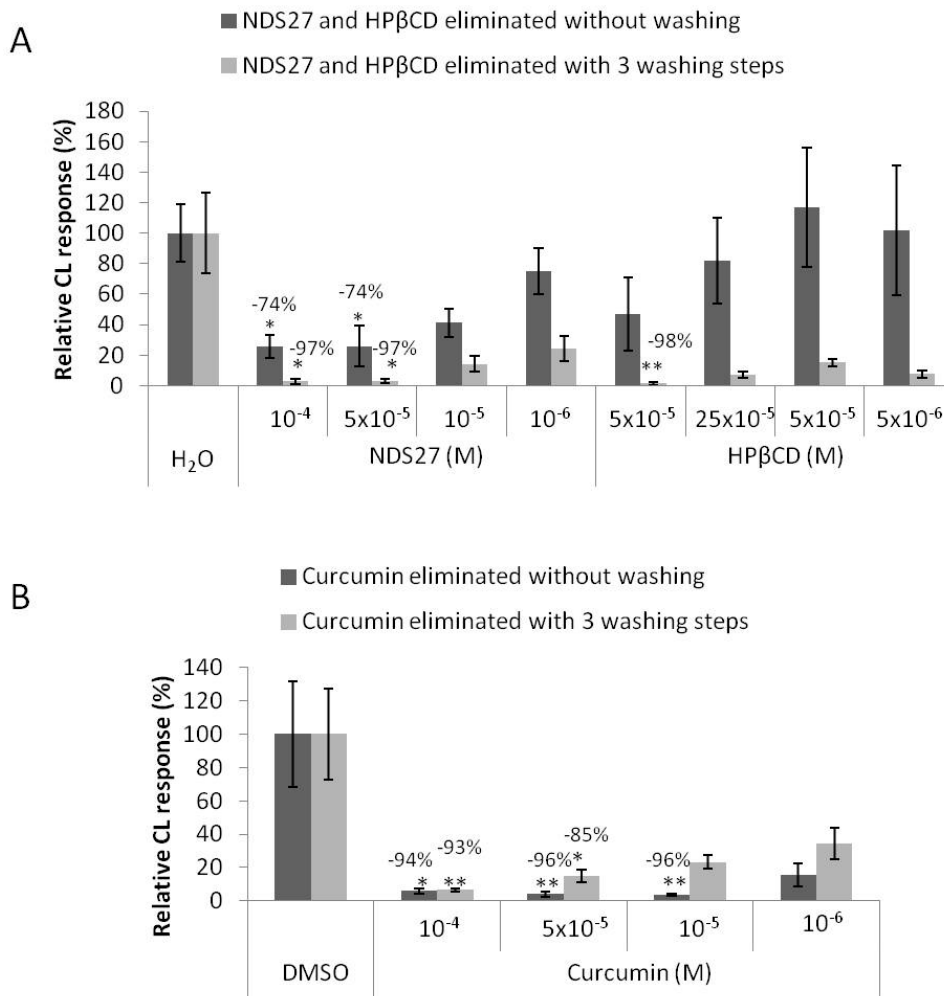


Figure 58. Effect of curcumin (Fig.7B) or NDS27 and HP β CD (Fig.7A) on NADPH oxidase assembly measured by EquiNox2. Curcumin (10^{-6} to 10^{-4} M) and NDS27 (10^{-6} to 10^{-4} M) or HP β CD (5×10^{-6} to 5×10^{-4} M) were simply eliminated by emptying the wells (dark grey) or more intensively eliminated by 3 washing steps (light grey) to evaluate the bound strength between the molecule and the membrane subunits. The percentages of inhibition indicated above each column were calculated versus DMSO vehicle control group for curcumin and H₂O vehicle control group for NDS27 and HP β CD. Data are given as mean \pm S.E.M. ($n \geq 5$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

When curcumin was incubated with washed membranes and then eliminated by emptying the well, it significantly reduced, until 10^{-5} M, the NADPH oxidase activity (-96 %, Figure 58B). The effect was slightly less marked when the molecule was removed after three washings with significant inhibitions observed from 5×10^{-5} M (-85 %, Figure 58B).

The water soluble form of curcumin (NDS27) seems to be a less efficient inhibitor than curcumin on NADPH oxidase activity in EquiNox2, since after its elimination, without washing, it induced an inhibition from 5×10^{-5} M (-74 %) to 10^{-4} (Figure 58A). When it was eliminated by washings, the NDS27 maintained and even amplified its inhibitory effect on bound membranes from 5×10^{-5} M (-97 %, Figure 58A).

The excipient of NDS27, (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HP β CD), had no effect when simply eliminated from fixed membrane (Figure 58A). However, when it was washed, it presented a strong inhibitory effect (5×10^{-4} M).

Discussion

Among the enzymes producing ROS, implied in human [171] or horse pathologies [142], NADPH oxidase is an important therapeutic target as it produces $O_2^{\bullet-}$ from which derives most of the other ROS [29]. To study the effect of potential inhibitors on NADPH oxidase activity, there are many indirect methods based on the measurement of $O_2^{\bullet-}$ produced by whole cells, on the *in vitro* reconstitution of the enzyme using cell-free systems [2, 45, 95] or on the determination of the expression rate of the enzyme [174]. These techniques have inconveniences: they do not allow to ascertain the real target of the inhibitor (e.g. receptor, signal transduction pathway, enzyme,...) and they cannot exclude a direct scavenging effect on the superoxide anion [149]. Based on the cell free system [95], developed for equine Nox2, the new method, EquiNox2, has the main advantage of studying the direct interaction of potential Nox2 inhibitors with the enzyme or its membrane fractions. The binding of the membrane fractions or the entire complex onto the wells of a microplate allows to eliminate, with or without supplementary washings, the Nox2 inhibitor solutions before the revelation of the enzyme activity. We used plates with a hydrophilic surface optimised for the binding of IgG which also display an increased binding of many other proteins and biomolecules with hydrophilic/hydrophobic character [175], and we demonstrated that they were able to fix membrane proteins from neutrophils.

The optimal parameters to measure maximal activity of Nox2 by EquiNox2 were similar for the two experimental conditions: membrane binding before complex formation or entire complex binding after its assembly (Figure 52A and B). The optimal ratio between cytosolic and membrane proteins (i.e. 25) was similar to that previously determined for the CFS of equine Nox2 [95], but with a 2-fold higher protein concentrations. The buffer volume for an optimal fixation was 100 μ l, a volume usually used for enzymatic and immunological tests [6, 109]. The optimal incubation time and temperature for the protein binding were 2h and 4°C, which are easy working conditions. As Pilloud et al. (1989) described for CFS [88], the activation of Nox2 by AA depends on the concentration of cytosolic and membrane components of the enzyme in the non purified extracts. Thus the optimal AA concentration must be determined for each batch of PMNs. Compared to the CFS for equine Nox2[95], a double concentration of AA and GTP- γ -S (4 μ M) are necessary for EquiNox2 which also requires a two-fold higher protein content. The EquiNox2 response, was not significantly decreased by the washings. Washings are key step to eliminate the tested molecule, avoiding its direct scavenging effect on $O_2^{\bullet-}$, limiting its direct interference with the probe and allowing to distinguish inhibitors able or not to bind to the membrane or the entire complex. To ensure that the reaction between L-012 and $O_2^{\bullet-}$ was specific, a control assay was performed with SOD. The addition in the control test of 200 U/ml SOD, corresponding to the concentration used in CFS [95], inhibited almost all the CL response, leaving a residual CL value which was subtracted from all the other assays. This residual CL value is questionable and is probably due to the reaction with H_2O_2 [176].

Concerning the validation of EquiNox2, DPI, an uncompetitive inhibitor of flavoenzymes [150], reduced efficiently the oxidase activity in EquiNox2, when it was incubated with membranes or entire complex then simply eliminated, demonstrating its interaction with Nox2, membranes or complex. The reduction of the inhibitory effect of DPI by a supplementary washing step suggests a low and reversible bond between DPI and the enzyme. Previous studies showed that DPI binds flavocytochrome b_{558} at a site close to the NADPH binding site and acts by preventing fixation of NADPH [91] and abstracting an electron from FAD to form a radical [50]. It has also been suggested that DPI directly affects the heme component Gp91phox [49].

The chimeric peptide Gp91ds-tat, a potent inhibitor of human Nox2 [51], did not significantly act when the complex was already reconstituted. However, the peptide induced a significant inhibitory effect when it was added on the membranes and then eliminated before the complex assembly, suggesting an interference on the Nox2 assembly as already stated by De Leo et al. [92] and in our previous observations with CFS [95]. Curiously, when Gp91-ds-tat was eliminated with a washing step after its incubation with the membranes, the EquiNox2 response was further decreased. A hypothesis is that the interaction of Gp91ds-tat with membranes proteins weakens the membrane link to the plastic support with the consequence of membrane loss during the washing. The *tat* peptide could be implicated in this interaction, as it binds efficiently the membranes and is then internalised by an endocytosis process [177]. Gp91-phox is recognised to bind specifically the cytosolic protein p47phox [51, 69], but to our knowledge no studies have directly focused on the influence of the *tat* region on the association of p47phox with the membranes [18]. Although DPI and Gp91ds-tat are valuable inhibitors of NADPH oxidase for *in vitro* experiments, their use as therapeutic agent can be unadvised. Indeed, DPI is toxic for cells as it blocks the mitochondrial activity and impairs the activity of flavoenzymes [150]. It can also contribute to the oxidative stress by inhibiting enzymes involved in the pentose phosphate pathway controlling the intracellular reduced glutathione pool [49, 150]. Gp91ds-tat has a poor oral bioavailability and its propensity to induce immunogenic response in patients, limits its use in the treatment of vascular disease [18].

An alternative is to use natural molecules to inhibit NADPH oxidase without cellular toxicity. Among them, curcumin is a natural compound that has been widely studied for its anti-inflammatory and antioxidant capacities both on human [77, 126, 144] and horses [2, 6, 95, 105]. Our team had already demonstrated that the molecule, and its water-soluble form NDS27 (curcumin lysinate complexed with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP β CD)) [81], can interfere with the Nox2 assembly in CFS. We used here the EquiNox2 method to determine if these molecules interact with the membranes subunits of NADPH oxidase. We showed the ability of curcumin to interact with the membrane of Nox2, an effect which was maintained but reduced when the molecule was eliminated by a washing step. These observations confirm the capacity of curcumin to perturb the assembly of Nox2 [95], and suggest that its binding to the membrane fraction of Nox2 does not strongly resist to

washes. Curcumin is a lipophilic molecule that accumulates in biological membranes and disturbs membrane proteins especially those which need a conformational change for their activity as Nox2 [78]. These lipophilic properties are maybe responsible for the activities of curcumin on Nox2 assembly. NDS27, seemed to be less efficient than curcumin when the molecule was simply eliminated but had a better inhibitory effect when the molecule was washed. The excipient alone, HP β CD had no significant effect when it was simply eliminated but with the washing step, a significant inhibition of the EquiNox2 response was observed at the highest concentration used (5×10^{-5} M). These results suggest a strong interaction between membranes and NDS27, that could weaken the fixation of the membrane proteins to the plastic support, as already stated with Gp91-ds-tat. As we previously published [113], the combination of curcumin lysinate with HP β CD allows an exchange of the membrane lipids and cholesterol against curcumin. This curcumin incorporation into membranes is higher with NDS27 than with curcumin alone (personal observations), and these modifications in membranes composition can affect membrane binding strength onto the wells of the microplate.

Our EquiNox2 results clearly evidence that curcumin and NDS27 can strongly bind the membrane fraction and thus interfering with the enzyme assembly and activity. Further studies are needed to target the real nature of this link.

In conclusion, we designed a new method called EquiNox2, and have established its optimal working conditions to distinguish inhibitors that bind, strongly or not, to the membrane fraction or the entire complex of equine neutrophil NADPH oxidase and disturb its activity. By optimising and validating this research tool, we demonstrated that curcumin and its soluble derivative, NDS27, could strongly bind to the enzyme and prevent the NADPH oxidase assembly making these molecules good candidates for the treatment of horse or human pathologies implying an increase of oxidative stress linked with the oxidative burst of neutrophils.

Discussion générale et perspectives

Le "cell-free system" et l'EquiNox2

Les chevaux sont particulièrement sensibles à l'inflammation et certaines pathologies équine, comme les maladies gastro-intestinales, s'accompagnent d'une stimulation excessive des neutrophiles et de la libération de ROS dans le milieu extracellulaire, responsables de dégâts cellulaires secondaires et pouvant mener à la mort de l'animal [1, 68]. Une solution thérapeutique est de moduler l'activité des enzymes productrices de ROS et principalement l'activité de la NADPH oxydase, première enzyme de la cascade de production des ROS [29]. Cependant, les inhibiteurs actuellement décrits dans la littérature sont peu utilisés en thérapie par manque de spécificité ou parce qu'ils ne remplissent pas les critères de sécurité [29]. Les études précédemment réalisées au CORD sur les inhibiteurs potentiels de la NADPH oxydase utilisaient principalement des méthodes indirectes en mesurant la production d' $O_2^{\bullet-}$ libérés par les neutrophiles stimulés [2, 58, 60, 105, 178]. Pour tester des inhibiteurs spécifiquement sur l'activité de la NADPH oxydase équine, une solution est d'utiliser la technique "cell-free system", consistant en la reconstitution *in vitro* de la NADPH oxydase après avoir séparé ses sous-unités cytosoliques et membranaires. Au début de ma thèse, cette technique pour la mesure de l'activité de l'enzyme équine n'était pas disponible au CORD.

Développement, optimisation et validation du "cell-free system"

Nous avons développé et validé cette technique pour mesurer l'activité de la NADPH oxydase des PMNs équins à partir de méthodes publiées pour les enzymes humaines ou d'autres espèces [86-89], car la méthode publiée par Heyneman et *al.* (1984) pour la Nox2 équine n'a jamais donné de résultats concluants dans nos conditions de travail [85]. Nous avons déterminé les conditions optimales en protéines cytosoliques, en protéines membranaires, en agents stimulant l'assemblage de l'enzyme (l'arachidonate de sodium et le GTP- γ -S) afin d'obtenir une production maximale d' $O_2^{\bullet-}$ par l'enzyme. Comparée à des techniques "cell-free system" pour la Nox2 humaine [87, 145], la quantité de protéines membranaires que nous utilisons (2 μ g) est largement inférieure aux concentrations utilisées dans ces techniques (entre 10 et 30 μ g), pour une production d' $O_2^{\bullet-}$ similaire dans nos conditions ($304,97 \pm 94,36$ nmol d' $O_2^{\bullet-}$ /min/mg de protéines) contre 215 ± 21 nmol d' $O_2^{\bullet-}$

/min/mg de protéines dans les conditions de Batot et *al.* (1995) [145]. La concentration en SOD permettant d'inhiber la réduction du ferricytochrome C due à l' $O_2^{\bullet-}$ (200 U/ml dans nos conditions) est d'ailleurs comparable à celle utilisée par Gillibert et *al.* (2005) [87], suggérant que l'activité de l'enzyme équine pourrait être supérieure à celle de l'enzyme humaine. Les concentrations en GTP- γ -S (2 μ M) et en arachidonate de sodium (50-80 μ M) que nous utilisons pour l'assemblage de la Nox2 équine sont également inférieures à celles utilisées pour la NADPH oxydase humaine (entre 80 et 120 μ M d'arachidonate de sodium et entre 10 et 40 μ M en GTP- γ -S). Par contre, proportionnellement à la quantité de protéines membranaires, nous utilisons plus de protéines cytosoliques suggérant que la quantité de sous-unités cytosoliques récupérée dans nos échantillons est plus faible que celle obtenue par les techniques de Batot et *al.* (1995) et Gillibert et *al.* (2005).

La mesure de la production d' $O_2^{\bullet-}$ en "cell-free system" est généralement réalisée par spectrophotométrie dans des cuvettes individuelles [85, 87, 145, 179]. Nous avons, pour notre part, opté pour un dosage en microplaques de 96 puits, ce qui nous apporte l'avantage de pouvoir réaliser plus rapidement un plus grand nombre de tests et de pouvoir comparer l'effet de différents inhibiteurs ou de différentes concentrations d'un inhibiteur dans les mêmes conditions et sur la même microplaque.

La validation de notre "cell-free system" a été réalisée avec des inhibiteurs connus de la NADPH oxydase : le DPI et le Gp91ds-tat. Ces molécules inhibent le signal obtenu en "cell-free system" et confirment, d'une part, que nous mesurons bien l'activité de la NADPH oxydase et, d'autre part, que ces molécules sont également actives sur l'enzyme équine. A notre connaissance, l'effet inhibiteur du Gp91ds-tat n'a jamais été démontré sur la Nox2 équine tandis que l'effet inhibiteur du DPI n'a été démontré que par une technique de mesure de production d'anion superoxyde avec des PMNs isolés [3]. Par ailleurs, nous avons exploité deux conditions pour étudier les effets d'inhibiteurs potentiels : une première condition où les molécules sont ajoutées avant l'assemblage et la seconde où les molécules sont ajoutées après l'assemblage de l'enzyme, nous permettant ainsi de déterminer si elles agissent plutôt en empêchant l'assemblage de la Nox2 ou sur l'activité du complexe reconstitué. Les résultats obtenus ont montré que le DPI agissait sur l'enzyme reconstituée, confirmant son activité décrite dans la littérature : il interfère avec la fixation du NADPH et extrait les électrons de la chaîne de transport du flavocytochrome b_{558} [50, 91]. Le Gp91ds-

tat, lui, inhibe l'assemblage de l'enzyme en interférant avec l'assemblage des sous-unités p47phox et Gp91phox, montrant que cette région est conservée chez le cheval par rapport à d'autres espèces [51, 92-94].

Le "cell-free system" présente l'avantage, par rapport à des techniques où l'on mesure la production d' $O_2^{\bullet-}$ sur des neutrophiles entiers, d'étudier directement l'effet d'inhibiteurs potentiels sur l'activité de l'enzyme. En plus, la mesure de la production d' $O_2^{\bullet-}$ via la réduction du ferricytochrome C permet de quantifier les $O_2^{\bullet-}$ produits grâce à une réaction de stœchiométrie 1 : 1 [36]. Par rapport à d'autres "cell-free system" décrits dans la littérature [87, 145], notre technique développée à partir des neutrophiles équins présente divers avantages supplémentaires : (1) l'utilisation de plus faibles concentrations en protéines membranaires et en agents stimulants, (2) la rapidité de la technique et (3) l'utilisation de plaques multi-puits permettant de réaliser de nombreux tests en parallèle et de tester plusieurs inhibiteurs dans les mêmes conditions. Les techniques "cell-free system" présentent néanmoins un inconvénient majeur : elles ne permettent pas d'éliminer la molécule testée avant la mesure et celle-ci peut interférer avec la sonde utilisée pour la révélation de l'activité enzymatique [90] ou réagir en tant que "scavenger" avec les $O_2^{\bullet-}$ produits.

Développement, optimisation et validation de l'EquiNox2

Pour limiter ces interférences et les effets "scavenger" des molécules, notre première idée était de développer une méthode immuno-enzymatique appelée SIEFED pour la NADPH oxydase équine, comme notre équipe l'a décrit pour la MPO [56, 57]. Cette technique aurait consisté à capturer de manière spécifique, par des anticorps, une fraction de la Nox2 ou l'enzyme entière afin de mesurer son activité et de tester spécifiquement des inhibiteurs sur celle-ci. Cependant, il n'existe pas sur le marché des anticorps reconnaissant spécifiquement la NADPH oxydase équine et, jusqu'à présent, nos tentatives pour purifier l'enzyme dans le but de produire des anticorps n'ont pas abouti. Nous avons donc trouvé une alternative aux anticorps et développé la technique EquiNox2 où la fixation de la NADPH oxydase se fait par le biais de microplaques optimisées pour la fixation de protéines et d'anticorps via des liaisons hydrophiles et/ou hydrophobes [175]. En utilisant ces microplaques, nous sommes parvenus à fixer les protéines membranaires ou la Nox2 entière puis à mesurer son activité *in vitro*.

Nous avons montré qu'il est possible de mesurer l'activité de l'enzyme fixée sur un support et que la fixation des protéines membranaires n'empêchait pas l'assemblage du complexe. Au contraire, en fixant d'abord les protéines cytosoliques sur la microplaque, il est impossible de reconstituer l'enzyme et de mesurer son activité. Une autre étape cruciale pour réaliser cette technique était de pouvoir détecter de manière sensible les $O_2^{\bullet-}$ produits par l'enzyme. L'utilisation du ferricytochrome C, sonde de référence pour le "cell-free system", est impossible en EquiNox2 car elle est trop peu sensible [36]. C'est pourquoi, nous avons opté pour une sonde chimiluminescente, le L-012, plus sensible pour la détection de l' $O_2^{\bullet-}$ [173].

L'optimisation de la méthode a consisté en la recherche des concentrations en protéines et activateurs à utiliser pour permettre une production maximale d' $O_2^{\bullet-}$. Cette optimisation a été réalisée pour les deux variantes de l'EquiNox2 (fixation des membranes ou du complexe assemblé *in vitro*) avec conditions optimales similaires obtenues pour les deux variantes. Le rapport protéines cytosoliques/protéines membranaires (rapport de 25), déterminé comme optimal pour le "cell-free system", est conservé pour l'EquiNox2. Par contre, la concentration en protéines nécessaire pour obtenir l'activité maximale de l'enzyme est presque double par rapport au "cell-free system" (3,5 μ g de membranes et 87,5 μ g de cytosol pour l'EquiNox2 contre 2 μ g de membranes et 50 μ g de cytosol pour le "Cell-free system"). De même, les concentrations optimales en arachidonate de sodium (déterminées pour chaque lot de PMNs) et en GTP- γ -S ont été doublées par rapport au "cell-free system".

Nous avons établi les paramètres permettant la meilleure fixation du complexe ou des protéines membranaires : le volume de tampon (100 μ L), la température (4°C) et la durée d'incubation (2h). Nous avons également démontré qu'il était possible d'opérer des lavages après cette étape de fixation et que la réalisation de trois lavages ne diminuait pas significativement l'activité de la Nox2, suggérant que la fixation des protéines aux microplaques via des liaisons hydrophiles et/ou hydrophobes est relativement forte. Cette étape de lavage est très importante car elle permet d'éliminer de manière exhaustive les inhibiteurs potentiels incubés avec les membranes ou les complexes fixés sur les microplaques. Tout comme en "cell-free system", nous nous sommes assurés que la réponse obtenue était spécifique de l' $O_2^{\bullet-}$, en réalisant un contrôle avec une concentration saturante en SOD (200 U/ml) qui permet de dismuter les $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Cependant, il semblerait que le

signal persistant obtenu en présence de SOD serait dû à une réaction de l' H_2O_2 avec le L-012 [176].

Afin de valider l'EquiNox2 nous avons utilisé les mêmes inhibiteurs (DPI et le Gp91ds-tat) que ceux utilisés pour le "cell free system" et nous les avons testés avec les deux variantes de la technique. Dans une première condition, les molécules sont incubées avec les membranes ou les complexes fixés et éliminées en vidant simplement les puits. Dans une seconde condition, les molécules sont pré-incubées avec les membranes ou complexes fixés puis sont éliminées et lavées. Par ces différentes variantes, l'EquiNox2 apparaît être un outil polyvalent permettant de vérifier si la molécule testée interfère sur l'assemblage de la Nox2 ou si elle agit sur le complexe reconstitué, tout en précisant si la molécule se fixe sur les protéines membranaires ou sur le complexe protéique entier et si cette fixation est labile ou forte.

Ainsi, nous avons confirmé que le DPI agit plutôt sur l'activité de la Nox2 que sur son assemblage et qu'il est capable de se lier aux sous-unités membranaires et sur l'enzyme entière, probablement parce que le flavocytochrome b_{558} reste accessible lorsque le complexe est reconstitué, mais que cette liaison est affaiblie lorsque l'on réalise des lavages. Nous avons également confirmé que le Gp91ds-tat empêche l'assemblage de l'enzyme équine et qu'il interagit avec les sous-unités membranaires de la Nox2. Nous supposons qu'il s'agit d'une liaison forte car cette molécule est plus efficace lorsqu'elle est éliminée par lavage que simplement vidée des puits et que cette forte liaison avec les protéines membranaires accompagnées d'un lavage, affaiblit la liaison des membranes sur le support en plastique. Cette interaction est sans doute aspécifique puisque le Gp91ds-tat est décrit comme se fixant à p47phox et empêchant son association au flavocytochrome b_{558} [69]. Il est possible que la partie tat du peptide soit responsable de la fixation aux protéines membranaires car il est utilisé pour l'internalisation du Gp91ds-tat et se fixe rapidement aux cellules pour y être ensuite incorporé par endocytose [177]. Une implication potentielle de tat dans la modulation de l'activité de la NADPH oxydase reste à démontrer. Toutefois, ce peptide peut induire la production de ROS via la NADPH oxydase dans des cellules nerveuses [180].

Par rapport au "cell-free system", l'EquiNox2 apporte des informations supplémentaires sur les interactions entre les molécules testées et les sous-unités membranaires, ou l'enzyme reconstituée, et sur la force de cette interaction. Cependant, il faut remarquer que cette technique est plus difficile à mettre en œuvre par rapport au "cell-free system" et qu'elle est plus coûteuse en temps, en concentration protéique et en réactifs.

Conclusions

Les travaux présentés dans ce travail décrivent deux nouvelles méthodes, le "cell-free system", dérivé de méthodes publiées pour d'autres espèces, et l'EquiNox2, technique originale jamais décrite dans la littérature. Ces techniques sont des outils indispensables et complémentaires à la recherche de nouveaux inhibiteurs capables de moduler l'activité de la NADPH oxydase équine dans un but thérapeutique, lors de pathologies où la stimulation excessive des neutrophiles joue un rôle néfaste. Par leur utilisation, nous pouvons aider à la compréhension du mode d'action d'inhibiteurs potentiels de la Nox2, notamment en précisant s'ils agissent sur la reconstitution de l'enzyme, sur son activité et s'ils peuvent se lier plus ou moins fortement à ses sous-unités.

Effet de molécules d'origine naturelle sur l'activité de la NADPH oxydase

Sur base d'études précédentes [2, 59] réalisées au CORD et de leurs propriétés anti-inflammatoires décrites dans la littérature [4, 77, 151], nous avons sélectionné trois inhibiteurs potentiels de la NADPH oxydase, la curcumine et son dérivé soluble, le NDS27, et le resvératrol. Sans technique permettant de déterminer directement l'effet de ces molécules sur l'activité de l'enzyme, nous ne pouvions confirmer cette hypothèse ni expliquer leurs mécanismes d'action. Avec des outils supplémentaires développés au cours de ma thèse, nous avons pu approfondir les mécanismes d'action du resvératrol, de la curcumine et du NDS27 sur l'activité de la NADPH oxydase et sur la réponse oxydante des neutrophiles.

Nos travaux ont montré que la curcumine et le resvératrol sont tous les deux capables d'inhiber la production d'O₂^{•-} par les PMNs probablement, en partie, par leur effet "scavenger", largement décrit dans la littérature [79, 96]. Bien que ces molécules soient toutes les deux lipophiles [78, 152], nous avons montré que la curcumine est plus efficace que le resvératrol et semble être plus facilement intégrée aux cellules ou à leurs membranes, lui permettant d'avoir un effet intracellulaire et/ou membranaire. Ces molécules sont également connues pour inhiber l'activité de la MPO [2, 59], réduire l'expression de la NADPH oxydase [181, 182] et agir sur l'activité de la PKC [111, 154]. Nous avons montré en "cell-free system" qu'elles pouvaient agir directement sur l'activité de la NADPH oxydase. Le resvératrol semble être efficace principalement après la reconstitution du complexe, mais un effet "scavenger" de cette molécule n'est pas à exclure. Cependant, Chow et *al.* (2007) ont démontré que le resvératrol pouvait empêcher l'assemblage de Rac au flavocytochrome b₅₅₈ [143]. Par rapport au resvératrol, la curcumine inhibe plus efficacement et à plus faible dose (10⁻⁵ M) l'assemblage de la Nox2, démontrant pour la première fois un effet direct de la curcumine sur cette enzyme. Par la technique EquiNox2, nous avons mis en évidence une interaction forte de la curcumine avec les sous-unités membranaires de l'enzyme et l'enzyme entière. La lipophilie de cette molécule lui permet de s'accumuler dans les biomembranes et de réduire son épaisseur, sa mobilité et son élasticité affectant la fonction des protéines membranaires et plus particulièrement celles qui nécessitent un changement de conformation pour leur activité comme la Nox2 [78, 116, 137], expliquant les interférences sur l'assemblage et l'activité de la Nox2. La capacité de la

curcumine à entrer facilement dans les PMNs ou à interagir avec leur membrane et à inhiber efficacement l'activité de la NADPH oxydase en fait un meilleur candidat que le resvératrol pour le traitement des pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques, mais sa faible solubilité dans l'eau combinée à une faible résorption intestinale réduit son utilisation thérapeutique [75, 77]. C'est pourquoi notre équipe et d'autres [80, 164, 183] étudient les bénéfices de complexer la curcumine avec d'autres molécules pour augmenter sa biodisponibilité.

Nous avons synthétisé le NDS27, un complexe de lysinate de curcumine avec l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine, ce complexe est soluble dans l'eau, contrairement à la curcumine, et ne présente pas de toxicité vis-à-vis des cellules [105]. Il inhibe efficacement la production de ROS par les neutrophiles et les cellules immatures HL-60. Il agit non seulement de façon extracellulaire, c'est-à-dire via un effet "scavenger" comme décrit pour la curcumine [31, 75], mais nous avons montré qu'il possède également une activité intracellulaire et/ou membranaire importante. En effet, la curcumine du NDS27 est capable de s'incorporer dans les membranes. Nos résultats démontrent une incorporation plus élevée de la curcumine dans les HL-60 par rapport aux PMNs, ce qui est sans doute dû à la différence de composition en lipides et protéines des membranes de ces deux types cellulaires [106, 107]. La présence de l'HP β CD et sa capacité à extraire le cholestérol [135, 136] peuvent jouer un rôle dans l'activité membranaire du NDS27. En effet, les cellules prolifératives, comme c'est le cas des HL-60, sont particulièrement riches en cholestérol par rapport aux cellules normales [108], expliquant la meilleure incorporation de la curcumine du NDS27 dans ces cellules.

La curcumine qui a intégré les membranes plasmiques, ou qui est entrée dans le cytosol, peut alors agir sur les enzymes impliquées dans la chaîne respiratoire. Nous avons montré que le NDS27 module l'activité de trois enzymes : la myéloperoxydase, la NADPH oxydase et la PKC. Le NDS27 est capable de se fixer à la MPO et d'inhiber son activité. Son effet sur la NADPH oxydase est multiple. Il agit d'une part sur la PKC, enzyme fortement impliquée dans l'activation de Nox2 [12, 184], en perturbant sa translocation vers la membrane et en inhibant son activité, comme cela a été démontré pour la curcumine "classique" [76, 111, 112]. Mais, nos résultats démontrent également que le NDS27 agit directement sur la NADPH oxydase en se fixant fortement à ses sous-unités membranaires et en empêchant

son assemblage. Ces résultats confirment ceux que nous avons obtenus avec la curcumine [95] et montrent que le NDS27 est encore plus efficace pour inhiber l'activité de la NADPH oxydase et ce, grâce à la présence de l'HP β CD. En effet, nous avons démontré que le mode d'action du NDS27 sur la translocation de la PKC et l'assemblage de la NADPH oxydase est dû à la combinaison originale de l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine avec le lysinate de curcumine. Pour le confirmer, nous avons utilisé un autre complexe, le NDS28, formé de lysinate de curcumine avec la γ -cyclodextrine et nous avons montré que le changement de cyclodextrine annihile les effets de la molécule sur ces deux enzymes.

Nos études, avec une technique de coloration des lipides à l'"Oil Red O" et une technique de résonance paramagnétique utilisant des sondes lipophiles, ont montré que le NDS27 influence le contenu lipidique des cellules pré-incubées avec cette molécule. Le NDS27 extrait facilement les lipides et le cholestérol membranaires (ou les sondes lipophiles ancrées dans la membrane dans le cas de l'EPR) qui, en contrepartie, sont échangés contre le lysinate de curcumine initialement présent dans l'HP β CD. Parmi, les cyclodextrines, les β -CD sont les meilleurs accepteurs de stérols grâce à la taille de leur cavité qui est compatible avec la taille de ces molécules [84]. Au niveau des membranes et des radeaux lipidiques, le cholestérol joue un rôle stabilisateur et son extraction par les cyclodextrines [138, 168] est responsable de la dissociation des protéines membranaires qui deviennent non fonctionnelles [35]. Les radeaux lipidiques sont importants pour l'activation de la PKC et de la Nox2 [117, 118] et l'extraction du cholestérol de ces domaines est responsable d'une diminution de la translocation des sous-unités cytosoliques de la Nox2 [118, 141]. L' HP β CD ne joue donc pas seulement un rôle dans la solubilisation du lysinate de curcumine, mais elle a aussi un rôle majeur dans l'activité du complexe : elle favorise l'incorporation de la curcumine dans les membranes plasmiques et l'arrachement de cholestérol, ce qui perturbe les radeaux lipidiques et l'activité des protéines membranaires. Dans le NDS28, l'utilisation de la γ -CD, une cyclodextrine ayant moins d'affinité pour le cholestérol, empêche cet échange contrairement à l'HP β CD, ce qui explique la meilleure incorporation du NDS27 dans les cellules HL-60 ayant plus de cholestérol que les PMNs. De plus, Mercader-Ros et *al.* (2010) ont montré que l'HP β CD augmente la capacité antioxydante des flavonoïdes complexés en les protégeant de l'oxydation par les espèces radicalaires [166].

Conclusions

Le choix de la cyclodextrine est essentiel pour préserver et améliorer la capacité du sel de curcumine à interagir avec les membranes, les radeaux lipidiques et les sous-unités membranaires de la Nox2; pour perturber l'activation de la PKC et l'assemblage de la Nox2; et pour assurer l'entrée de la curcumine dans le cytosol, lui permettant d'agir sur les voies de signalisation impliquées dans l'activation de la Nox2 et la production de ROS. Le NDS27 est donc un excellent candidat pour la modulation de l'activation excessive des neutrophiles dans le cas de pathologies humaines ou équine accompagnées de réactions inflammatoires excessives.

Perspectives

Nos travaux présentent des nouvelles techniques pour mesurer l'activité de la NADPH oxydase équine et tester de nouvelles molécules modulant son activité. La technique originale EquiNox2 est un outil de recherche permettant de mettre en évidence des molécules interagissant avec l'enzyme mais, à l'heure actuelle, elle ne peut pas être considérée comme un outil de "screening" large pour tester de nombreuses molécules, vu sa complexité et le temps nécessaire pour sa réalisation. Pour améliorer cette technique, il serait nécessaire de réduire les quantités de protéines cytosoliques et membranaires, ce qui permettrait également de réduire les concentrations en activateurs. Pour cela, une solution sera de trouver un moyen d'augmenter la fixation spécifique des sous-unités de la NADPH oxydase provenant d'extraits cellulaires non purifiés ou de purifier ces sous-unités. Une stratégie sera de recouvrir les microplaques d'anticorps spécifiques ou de molécules qui ont une forte affinité pour le flavocytochrome b_{558} .

Il ressort également de notre étude que le NDS27 est un excellent modulateur de la réponse oxydante des neutrophiles, ce qui en fait un bon candidat pour le traitement des pathologies inflammatoires où l'activation excessive des PMNs joue un rôle néfaste. Son injection sous forme d'aérosol est en cours d'étude pour le traitement des chevaux souffrant d'obstruction récurrentes des voies respiratoires (RAO), une pathologie inflammatoire caractérisée par une activation et une infiltration des PMNs au niveau des voies pulmonaires basses. Cette pathologie de type allergique apparaît chez certains chevaux exposés à du foin ou de la paille de mauvaise qualité. Les perspectives à court terme sont la réalisation d'une étude clinique multicentrique dans le but d'obtenir une autorisation de mise sur le marché du NDS27 pour le traitement de la RAO chez les chevaux. Les perspectives à long terme sont le développement de cette molécule sous d'autres formes pour le traitement de pathologies de type inflammatoire chez le cheval mais aussi chez l'homme. Une administration en intra-articulaire pourrait être envisagée pour le traitement de pathologies comme l'arthrite, orale pour réduire l'inflammation intestinale chronique observée dans la maladie de Crohn, ou encore sous forme de crème pour le traitement du Psoriasis. Une autre possibilité est l'étude du NDS27 pour une utilisation thérapeutique dans le cadre du cancer et la comparaison de son efficacité avec celle de la curcumine "classique" qui a des propriétés anticancéreuses connues.

Références bibliographiques

1. Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Myckalad, A., and Deby-Dupont, G. (2003) La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Annales de Médecine Vétérinaire*. **147**,79-93.
2. Franck, T., Kohnen, S., Grulke, S., Neven, P., Goutman, Y., Péters, F., Pirotte, B., Deby-Dupont, G., and Serteyn, D. (2008) Inhibitory effect of curcuminoids and tetrahydrocurcuminoids on equine activated neutrophils and myeloperoxidase activity. *Physiological Research*. **57**,577-587.
3. Franck, T., Kohnen, S., de la Rebière, G., Deby-Dupont, G., Deby, C., Niesten, A., and Serteyn, D. (2009) Activation of equine neutrophils by phorbol myristate acetate or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces a different response in reactive oxygen species production and release of active myeloperoxidase. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **130**(3-4),243-250.
4. Sandersen, C., Olejnik, D., Franck, T., Neven, P., Serteyn, D., and Art, T. (2011) Inhalation with NDS27 attenuates pulmonary neutrophilic inflammation in recurrent airway obstruction. *The Veterinary record*. **169**(4),100.
5. Young, B., Lowe, J.S., Stevens, A., and Heath, J.W., eds. (2008) *Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater (2ème édition)*. De Boeck ed.: Bruxelles. 49-51.
6. de la Rebière de Pouyade, G., Franck, T., Saliccia, A., Deby-Dupont, G., Grulke, S., Heyden, L.V., Sandersen, C., and Serteyn, D. (2010) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for equine neutrophil elastase measurement in blood: preliminary application to colic cases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **135**(3-4),282-288.
7. Carrichon, L. (2009) Régulation de l'activité NADPH oxydase phagocytaire. Mécanismes moléculaires de la super-activité oxydase du cytochrome b558 D-loopNox4-Nox2., in Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant, Université Joseph Fourier Grenoble. p. 181.
8. Borregaard, N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. **33**(5),657-670.
9. Borregaard, N., Sorensen, O.E., and Theilgaard-Monch, K. (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunology*. **28**(8),340-345.
10. Kumar, V. and Sharma, A. (2010) Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*. **10**(11),1325-1334.
11. Quinn, M.T. and Gauss, K.A. (2004) Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of Leukocyte Biology*. **76**(4),760-781.
12. Bertram, A. and Ley, K. (2011) Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*. **59**(2),79-87.
13. Underhill, D.M. and Ozinski, A. (2002) Phagocytosis of microbes : complexity in action. *Annual Review of Immunology*. **20**,825-852.
14. El-Benna, J., Dang, P.M., and Gougerot-Pocidallo, M.A. (2008) Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in Immunopathology*. **30**(3),279-289.

15. Amulic, B. and Hayes, G. (2011) Neutrophil extracellular traps. *Current Biology*. **21**(9),R297-R298.
16. Kirchner, T., Möller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T., and Behnen, M. (2012) The Impact of Various Reactive Oxygen Species on the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators of Inflammation*. **2012**,1-10.
17. Marcos, V., Zhou, Z., Yildirim, A.O., Bohla, A., Hector, A., Vitkov, L., Wiedenbauer, E.M., Krautgartner, W.D., Stoiber, W., Belohradsky, B.H., Rieber, N., Kormann, M., Koller, B., Roscher, A., Roos, D., Griese, M., Eickelberg, O., Doring, G., Mall, M.A., and Hartl, D. (2010) CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nature Medicine*. **16**(9),1018-1023.
18. Selemidis, S., Sobey, C.G., Wingler, K., Schmidt, H.H.H.W., and Drummond, G.R. (2008) NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacology & Therapeutics*. **120**(3),254-291.
19. Bedard, K. and Krause, K.-H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Review*. **87**,245-313.
20. Apel, K. and Hirt, H. (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*. **55**(1),373-399.
21. Yang, Y., Bazhin, A.V., Werner, J., and Karakhanova, S. (2013) Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology*. **32**(3),249-270.
22. Vignais, P.V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **59**(9),1428-1459.
23. Klebanoff, S. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leucocyte Biology*. **77**,598-625.
24. Deby, C. and Deby-Dupont, G. Site internet du Centre de l'Oxygène Recherche et Développement (CORD). 2010 [cited 2010 4 octobre]; Available from: <http://www2.ulg.ac.be/cord/>.
25. Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **39**(1),44-84.
26. Pryor, W.A. and Squadrito, G.L. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. **268**(5),L699-L722.
27. Deby-Dupont, G., Deby, C., and Lamy, M. (1999) Neutrophil myeloperoxidase revisited: it's role in health and disease. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*. **36**,500–501.
28. Kohen, R. and Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicology Pathology*. **30**(6),620-650.
29. Kim, J., Neupane, G., Lee, E., Jeong, B., Park, B., and Thapa, P. (2011) NADPH oxidase inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*. **21**(8),1147-1158.
30. Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., and Jore, D. (2003) Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique* 91-96.
31. Masuda, T., Maekawa, T., Hidaka, K., Bando, H., Takeda, Y., and Yamaguchi, H. (2001) Chemical studies on antioxidant mechanism of curcumin: analysis of oxidative

- coupling products from curcumin and linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**,2539-2547.
32. Cross, A.R. and Segal, A.W. (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes—prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. **1657**(1),1-22.
 33. Sheppard, F.R., Kelher, M.R., Moore, E.E., McLaughlin, N.J.D., Banerjee, A., and Silliman, C.C. (2005) Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *Journal of Leucocyte Biology*. **78**,1025-1042.
 34. Nauseef, W.M. (2004) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochemistry and Cell Biology*. **122**,277–291.
 35. Masoud, R., Bizouarn, T., and Houee-Levin, C. (2014) Cholesterol: A modulator of the phagocyte NADPH oxidase activity - A cell-free study. *Redox Biology*. **3**,16-24.
 36. Dahlgren, C., Karlsson, A., and Bylund, J. (2007) Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes, in *Methods in molecular biology - Neutrophils Methods and Protocols*, Quinn, M.T., Deleo, F.R., and Bokoch, G.M., Editors., Towota, New Jersey. p. 349-363.
 37. Sumimoto, H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Journal*. **275**,3249-3277.
 38. Heyworth, P.G., Cross, A.R., and Curnutte, J.T. (2003) Chronic granulomatous disease. *Current Opinion in Immunology*. **15**(5),578-584.
 39. Stasia, M., Cathebras, P., Lutz, M.-F., and Durieu, I. (2008) La granulomatose septique chronique. *La Revue de médecine interne*. **30**,221-232.
 40. Brandes, R.P. and Kreuzer, J. (2005) Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovascular Research*. **65**(1),16-27.
 41. Tauber, A.I. (1987) Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Blood*. **69**(3),711-720.
 42. Shiose, A. and Sumimoto, H. (2000) Arachidonic Acid and Phosphorylation Synergistically Induce a Conformational Change of p47 phox to Activate the Phagocyte NADPH Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(18),13793-13801.
 43. Hartfield, P.J. and Robinson, J.M. (1998) Arachidonic Acid Activates NADPH Oxidase by a Direct, Calmodulin-Regulated Mechanism. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. **56**(1),1-6.
 44. King, C., Jefferson, M., and Thomas, E. (1997) Secretion and inactivation of myeloperoxidase by isolated neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. **61**(3),293-302.
 45. Dagher, M.-C. and Pick, E. (2007) Opening the black box: lessons from cell-free systems on the phagocytes NADPH oxidase. *Biochimie*. **89**,1123-1132.
 46. Molshanski-Mor, S., Mizrahi, A., Ugolev, Y., Dahan, I., Berdichevsky, Y., and Pick, E. (2007) The reductionist approach to the study of NADPH oxidase assembly, or "All you wanted to know about cell-free assays but did not dare to ask", in *Methods in Molecular Biology - Neutrophils Methods and Protocols*, Quinn, M.T., Deleo, F.R., and Bokoch, G.M., Editors.: Towota, New Jersey. p. 385-428.
 47. Cifuentes-Pagano, E., Csanyi, G., and Pagano, P. (2012) NADPH oxidase inhibitors: a decade of discovery from Nox2ds to HTS. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **69**(14),2315-2325.

48. O'Donnell, B.V., Tew, D.G., Jones, O.T., and England, P.J. (1993) Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochemical Journal*. **290**(Pt 1),41-49.
49. Doroshow, J.H., Gaur, S., Markel, S., Lu, J., van Balgooy, J., Synold, T.W., Xi, B., Wu, X., and Juhasz, A. (2013) Effects of iodonium-class flavin dehydrogenase inhibitors on growth, reactive oxygen production, cell cycle progression, NADPH oxidase 1 levels, and gene expression in human colon cancer cells and xenografts. *Free Radical Biology and Medicine*. **57**(0),162-175.
50. Doussière, J. and Vignais, P.V. (1992) Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH oxidase complex of bovine neutrophils - Factor controlling the inhibitory potency of diphenylene iodonium in a cell-free system of oxidase activation. *European Journal of Biochemistry* **208**,61-71.
51. Rey, F.E., Cifuentes, M.E., Kiarash, A., Quinn, M.T., and Pagano, P.J. (2001) Novel Competitive Inhibitor of NAD(P)H Oxidase Assembly Attenuates Vascular O₂⁻ and Systolic Blood Pressure in Mice. *Circulation Research*. **89**(5),408-414.
52. Malle, E., Furtmüller, G., Sattler, W., and Obinger, C. (2007) Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British Journal of Pharmacology*. **152**,838-854.
53. Nauseef, W. (2003) Roles of Calreticulin and Calnexin in Myeloperoxidase Synthesis, in *Calreticulin second edition*, Eggleton, P. and Michalak, M., Editors. p. 63-74.
54. Zeng, J. and Fenna, R.E. (1992) X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. **226**(1),185-207.
55. SerTEyn, D., Deby-Dupont, G., Franck, T., and Kohnen, S. (2008) Bulletin 2008/48, Method and kit for the measurement of neutrophil cell activation, EP 1 711 817 B1.
56. Franck, T., Kohnen, S., Deby-Dupont, G., Grulke, S., Deby, C., and SerTEyn, D. (2006) A specific method for measurement of equine active myeloperoxidase in biological samples and in *in vitro* tests. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **18**,326-334.
57. Franck, T., Kohnen, S., Zouaoui, K., Antwerpen, P.V., Bosseloir, A., Niesten, A., Gash, O., Nys, M., Deby-Dupont, G., and SerTEyn, D. (2009) A new easy method for specific measurement of active myeloperoxidase in human biological fluids and tissue extract. *Talanta*. **80**,723-729.
58. Boly, R., Dessy, S., Kohnen, S., Kini, F., Lompo, M., Mouithys-Mickalad, A., Guissou, I.P., Dubois, J., Deby-Dupont, G., SerTEyn, D., and Franck, T. (2011) Modulatory activities of *Agelanthus dodoneifolius* (Loranthaceae) extracts on stimulated equine neutrophils and myeloperoxidase activity. *International Journal of Molecular Medicine*. **28**(2),261-270.
59. Kohnen, S., Franck, T., Antwerpen, P.V., Boudjeltia, K.Z., Mouithys-Mickalad, A., Deby, C., Moguilevsky, N., Deby-Dupont, G., Lamy, M., and SerTEyn, D. (2007) Resveratrol inhibits the activity of equine neutrophil myeloperoxidase by a direct interaction with the enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**,8080-8087.
60. Zeraik, M.L., SerTEyn, D., Deby-Dupont, G., Wauters, J.-N., Tits, M., Yariwake, J.H., Angenot, L., and Franck, T. (2011) Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. *Food Chemistry*. **128**(2),259-265.
61. KrÖncke, Fehsel, and Kolb, B. (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical & Experimental Immunology*. **113**(2),147-156.

62. Weinberg, J.B. (1998) Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Molecular Medicine*. **4**(9),557-591.
63. Massion, P., Preiser, C., and Balligand, J. (2002) Les espèces réactives de l'azote: bénéfiques ou délétères ? . *Nutrition clinique et métabolisme* **16**,248-252.
64. Daff, S. (2010) NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide*. **23**(1),1-11.
65. Saini, R., Patel, S., Saluja, R., Sahasrabudde, A.A., Singh, M.P., Habib, S., Bajpai, V.K., and Dikshit, M. (2006) Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies. *Journal of Leukocyte Biology*. **79**(3),519-528.
66. Smith, J.A. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of Leukocyte Biology*. **56**(6),672-686.
67. Ceusters, J.D., Mouithys-Mickalad, A.A., Franck, T.J., Derochette, S., Vanderplasschen, A., Deby-Dupont, G.P., and Serteyn, D.A. (2013) Effect of myeloperoxidase and anoxia/reoxygenation on mitochondrial respiratory function of cultured primary equine skeletal myoblasts. *Mitochondrion*. **13**(5),410-416.
68. Riggs, L.M., Franck, T., Moore, J.N., Krunkosky, T.M., Hurley, D.J., Peroni, J.F., de la Rebière, G., and Serteyn, D.A. (2007) Neutrophil myeloperoxidase measurements in plasma, lamina propria, and skin of horses given black walnut extract. *American Journal of Veterinary Research*. **68**(1),81-86.
69. Kleniewska, P., Piechota, A., Skibska, B., and Gorąca, A. (2012) The NADPH Oxidase Family and its Inhibitors. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. **60**(4),277-294.
70. Ximenes, V.F., Kanegae, M.P.P., Rissato, S.R., and Galhiane, M.S. (2007) The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **457**(2),134-141.
71. Diatchuk, V., Lotan, O., Koshkin, V., Wikstroem, P., and Pick, E. (1997) Inhibition of NADPH Oxidase Activation by 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl Fluoride and Related Compounds. *Journal of Biological Chemistry*. **272**(20),13292-13301.
72. Bartimoccia, S., Nocella, C., Pastori, D., Pignatelli, P., and Carnevale, R. (2015) Platelet Oxidative Stress and Antioxidant Nutrients. *Journal of Vascular Medicine & Surgery*. **2**(164),2.
73. Davalos, A., de la Pena, G., Sanchez-Martin, C.C., Teresa Guerra, M., Bartolome, B., and Lasuncion, M.A. (2009) Effects of red grape juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells. *British Journal of Nutrition*. **102**(8),1125-1135.
74. Sandersen, C., Bienzle, D., Cerri, S., Franck, T., Derochette, S., Neven, P., Mouytis-Mickalad, A., and Serteyn, D. (2015) Effect of inhaled hydrosoluble curcumin on inflammatory markers in broncho-alveolar lavage fluid of horses with LPS-induced lung neutrophilia. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*. **10**(1),015-0010.
75. Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., and Srimal Rikhab, C. (2006) Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sciences*. **78**,2081-2087.
76. Shishodia, S., Sethi, G., and Aggarwal, B.B. (2005) Curcumin: getting back to the roots. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1056**(1),206-217.
77. Jurenka, J.S. (2009) Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical Research. *Alternative Medicine Review*. **14**(2),141-153.

78. Ingolfsson, H.I., Koeppe, R.E., and Andersen, O.S. (2007) Curcumin is a modulator of bilayer material properties. *Biochemistry*. **46**(36),10384-10391.
79. Ak, T. and Gülçin, I. (2008) Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*. **174**(1),27-37.
80. Yadav, V.R., Suresh, S., Devi, K., and Yadav, S. (2009) Effect of cyclodextrin complexation of curcumin on its solubility and antiangiogenic and anti-inflammatory activity in rat colitis model. *AAPS PharmSciTech*. **10**(3),752-762.
81. Neven, P., Sertheyn, D., Delarge, J., Kiss, R., Mathieu, V., Cataldo, D., and Rocks, N. (2009) World intellectual property organization (2009) International Publication number WO/2009/144220 A1: Water soluble curcumin compositions for use in anti-cancer and anti-inflammatory therapy. <http://www.wipo.int/patentscope/search/en/WO2009144220>. Accessed July 13, 2011.
82. Davis, M.E. and Brewster, M.E. (2004) Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*. **3**(12),1023-1035.
83. Del Valle, E.M.M. (2004) Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. **39**(9),1033-1046.
84. López, C.A., de Vries, A.H., and Marrink, S.J. (2011) Molecular Mechanism of Cyclodextrin Mediated Cholesterol Extraction. *PLOS Computational Biology*. **7**(3),e1002020.
85. Heyneman, R.A. and Vercauteren, R.E. (1984) Activation of a NADPH oxidase from horse polymorphonuclear leukocytes in a cell-free system. *Journal of Leukocyte Biology*. **36**,751-759.
86. Paclet, M.-H., Beryhier, S., Kuhn, L., Garin, J., and Morel, F. (2006) Regulation of phagocyte NADPH oxidase activity: identification of two cytochrome b₅₅₈ activation states. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. **21**(4),1244-1255
87. Gillibert, M., Dehry, Z., Terrier, M., Benna, J.E., and Lederer, F. (2005) Another biological effect of tosylphenylalanylchloromethane (TPCK): it prevents p47phox phosphorylation and translocation upon neutrophil stimulation. *Biochemical Journal*. **387**,549-556.
88. Pilloud, M.-C., Doussiere, J., and Vignais, P.V. (1989) Parameters of activation of the membrane-bound O₂^{•-} generating oxydase from bovine neutrophils in a cell-free system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **159**,783-790.
89. Miki, T., Yoshida, L.S., and Kakinuma, K. (1992) Reconstitution of superoxide-forming NADPH oxidase activity with cytochrome b₅₅₈ purified from porcine neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**,18695-18701.
90. Derochette, S. (2010-2011) Activité et modulation de la NADPH oxydase des neutrophiles équins : tests *in vitro* sur cellules entières et mise au point du dosage en "cell-free system", in Département des Sciences de la Vie, Université de Liège: Liège. p. 50.
91. Cross, A.R. and Jones, O.T.G. (1986) The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. *Biochemichal Journal*. **237**,111-116.
92. DeLeo, F.R., Yu, L., Burritt, J.B., Loetterle, L.R., Bond, C.W., Jesaitis, A.J., and Quinn, M.T. (1995) Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **92**(15),7110-7114.

93. Jung, O., Schreiber, J.G., Geiger, H., Pedrazzini, T., Busse, R., and Brandes, R.P. (2004) gp91phox-Containing NADPH Oxidase Mediates Endothelial Dysfunction in Renovascular Hypertension. *Circulation*. **109**(14),1795-1801.
94. Weaver, M., Liu, J., Pimentel, D., Reddy, D.J., Harding, P., Peterson, E.L., and Pagano, P.J. (2006) Adventitial delivery of dominant-negative p67phox attenuates neointimal hyperplasia of the rat carotid artery. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*. **290**(5),H1933-1941.
95. Derochette, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Ceusters, J., Deby-Dupont, G., Lejeune, J.-P., Neven, P., and Serteyn, D. (2013) Curcumin and resveratrol act by different ways on NADPH oxidase activity and reactive oxygen species produced by equine neutrophils. *Chemico-Biological Interactions*. **206**(2),186-193.
96. Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., and Shi, X. (2003) Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **309**(4),1017-1026.
97. Derochette, S., Serteyn, D., Mouithys-Mickalad, A., Ceusters, J., Deby-Dupont, G., Neven, P., and Franck, T. (2015) EquiNox2: a new method to measure NADPH oxidase activity and to study effect of inhibitors and their interactions with the enzyme. *Talanta*, Under review.
98. Breitman, T.R., Selonick, S.E., and Collins, S.J. (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **77**(5),2936-2940.
99. Collins, S. (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*. **70**(5),1233-1244.
100. Teufelhofer, O., Weiss, R.-M., Parzefall, W., Schulte-Hermann, R., Micksche, M., Berger, W., and Elbling, L. (2003) Promyelocytic HL-60 cells express NADPH oxidase and are excellent targets in a rapid spectrophotometric microplate assay for extracellular superoxide. *Toxicological Sciences*. **76**(2),376-383.
101. Caldefie-Chézet, F., Walrand, S., Moinard, C., Tridon, A., Chassagne, J., and Vasson, M.-P. (2002) Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. *Clinica Chimica Acta*. **319**,9-17.
102. Myhre, O., Andersen, J.M., and Fonnum, H.A.F. (2003) Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*. **65**,1575-1582.
103. Lin, C. and Wang, H. (2012) NADPH oxidase is involved in H₂O₂-induced differentiation of human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Cell Biology International*. **36**(4),391-395.
104. Nordenfelt, P., Bauer, S., Lonnbro, P., and Tapper, H. (2009) Phagocytosis of *Streptococcus pyogenes* by all-trans retinoic acid-differentiated HL-60 cells: roles of azurophilic granules and NADPH oxidase. *PLoS One*. **4**(10),e7363.
105. Derochette, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G., Neven, P., and Serteyn, D. (2013) Intra- and extracellular antioxidant capacities of the new water-soluble form of curcumin (NDS27) on stimulated neutrophils and HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions*. **201**(1-3),49-57.
106. Nojiri, H., Takaku, F., Ohta, M., Miura, Y., and Saito, M. (1985) Changes in glycosphingolipid composition during differentiation of human leukemic granulocytes

- in chronic myelogenous leukemia compared with in vitro granulocytic differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Cancer Research*. **45**(12 Pt 1),6100-6106.
107. Yanagida, M., Nakayama, H., Yoshizaki, F., Fujimura, T., Takamori, K., Ogawa, H., and Iwabuchi, K. (2007) Proteomic analysis of plasma membrane lipid rafts of HL-60 cells. *Proteomics*. **7**(14),2398-2409.
 108. Sánchez-Martín, C.C., Dávalos, A., Martín-Sánchez, C., de la Peña, G., Fernández-Hernando, C., and Lasunción, M.A. (2007) Cholesterol Starvation Induces Differentiation of Human Leukemia HL-60 Cells. *Cancer Research*. **67**(7),3379-3386.
 109. Franck, T., Grulke, S., Deby-Dupont, G., Deby, C., Duvivier, H., Peters, F., and Serteyn, D. (2005) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for specific equine neutrophil myeloperoxidase measurement in blood. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **17**(5),412-419.
 110. Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Robert, T., Ghitti, G., Deby-Dupont, G., Neven, P., and Serteyn, D. (2013) Differentiation between stoichiometric and anticatalytic antioxidant properties of benzoic acid analogues: A structure/redox potential relationship study. *Chemico-Biological Interactions*. **206**(2),194-203.
 111. Reddy, S. and Aggarwal, B.B. (1994) Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS Letters*. **341**(1),19-22.
 112. Rungseesantivanon, S., Thenchaisri, N., Ruangvejvorachai, P., and Patumraj, S. (2010) Curcumin supplementation could improve diabetes-induced endothelial dysfunction associated with decreased vascular superoxide production and PKC inhibition. *BioMed Central Complementary & Alternative Medicine*. **10**,48-57.
 113. Derochette, S., Mouithys-Mickalad, A., Franck, T., Collienne, S., Ceusters, J., Deby-Dupont, G., Neven, P., and Serteyn, D. (2014) NDS27 combines the effect of curcumin lysinate and hydroxypropyl- β -cyclodextrin to inhibit equine PKC δ and NADPH oxidase involved in the oxidative burst of neutrophils. *FEBS Open Bio*. **4**(0),1021-1029.
 114. Mazloum, H. (2013) Etude de la curcumine et d'un de ses dérivés soluble (le NDS28) sur la capacité oxydante intra- et extracellualire des neutrophiles et des HL-60, Institut Supérieur d'Enseignement Technologique (ISET). p. 52.
 115. Grammenos, A., Mouithys-Mickalad, A., Guelluy, P.H., Lismont, M., Piel, G., and Hoebeke, M. (2010) ESR technique for noninvasive way to quantify cyclodextrins effect on cell membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **398**(3),350-354.
 116. Hung, W.-C., Chen, F.-Y., Lee, C.-C., Sun, Y., Lee, M.-T., and Huang, H.W. (2008) Membrane-thinning effect of curcumin. *Biophysical Journal*. **94**,4331-4338.
 117. Shao, D., Segal, A.W., and Dekker, L.V. (2003) Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Letter*. **550**(1-3),101-106.
 118. Vilhardt, F. and van Deurs, B. (2004) The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *European Molecular Biology Organization Journal*. **23**(4),739-748.
 119. Dahlgren, C. and Karlsson, A. (1999) Respiratory burst in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*. **232**,3-14.
 120. Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Review*. **82**,47-95.
 121. SC, N. (1992) Non-steroidal anti-inflammatory drugs-uses and complications. *Singapore Medical Journal*. **33**(5),510-513.

122. Kikuchi, H., Kuribayashi, F., Kiwaki, N., and Nakayama, T. (2010) Curcumin dramatically enhance retinoic acid-induced superoxide generating activity via accumulation of p47-phox and p67-phox proteins in U937 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **395**,61-65.
123. Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J.M., Diaz-Alperi, J., and Ramirez, A. (2002) The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. **34**,37-46.
124. Reddy, R.C., Palakkodu G. Vatsalab, Keshamounia, V.G., and Padmanaban, G. (2005) Curcumin for malaria therapy *Biochemical and Biophysical Research Communication*. **326**(2),472-474.
125. Nakamura, Y., Murakami, A., and Ohigashi, H. (2000) Search for naturally-occurring antioxidative chemopreventors on the basis of the involvement of leukocyte-derived reactive oxygen species in carcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. **1**,115-120.
126. Deby-Dupont, G., Mouithys-Mickalad, A., SerTEYN, D., Lamy, M., and Deby, C. (2005) Resveratrol and curcumin reduce the respiratory burst of *Chlamydia*-primed THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **333**,21-27.
127. Pycock, J., Allen, W., and Morris, T. (1987) Rapid, single-step isolation of equine neutrophils on a discontinuous Percoll density gradient. *Research in Veterinary Science*. **43**(3),411-412.
128. Tennant, J.R. (1964) Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*. **2**(6),685-694.
129. Minguet, G., de la Rebiere, G., Franck, T., Joris, J., SerTEYN, D., and Sandersen, C. (2012) Sevoflurane inhibits equine myeloperoxidase release and activity in vitro. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. **11**(10),1467-2995.
130. Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G., and Gluud, C. (2007) Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. **297**(8),842-857.
131. Miller, E.R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R.A., Appel, L.J., and Guallar, E. (2005) Meta-analysis: High-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine*. **142**(1),37-46.
132. Tamatsu, S., Galal, A.M., Ross, S.A., Ferreira, D., ElSohly, M.A., Ibrahim, A.-R.S., and El-Ferally, F.S. (2003) Antioxidant effect of flavonoids on DCF production in HL-60 cells. *Phytotherapy Research*. **17**,963-966.
133. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. **20**(7),933-956.
134. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., and Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**(10),572-584.
135. Bland, E.J., Keshavarz, T., and Bucke, C. (2004) The influence of small oligosaccharides on the immune system. *Carbohydrate Research*. **339**(10),1673-1678.
136. Oh, H., Mohler, E.R., Tian, A., Baumgart, T., and Diamond, S.L. (2009) Membrane Cholesterol Is a Biomechanical Regulator of Neutrophil Adhesion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **29**(9),1290-1297.
137. Atsumi, T., Fujisawa, S., and Tonosaki, K. (2005) Relationship between intracellular ROS production and membrane mobility in curcumin- and tetrahydrocurcumin-

- treated human gingival fibroblasts and human submandibular gland carcinoma cells. *Oral Diseases*. **11**,236-242.
138. Castagne, D., Evrard, B., Nusgens, B., and Piel, R. (2010) Effect of beta-cyclodextrin and its derivatives on caveolae disruption, relationships with their cholesterol extraction capacities. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. **67**(3-4),8.
 139. Murakami, A. and Ohigashi, H. (2007) Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *International Journal of Cancer*. **121**,2357-2363.
 140. Liu, J.-Y., Lin, S.-J., and Lin, J.-K. (1993) Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells *Carcinogenesis*. **14**(5),857-861.
 141. Rama Rao, M., Raghu, H., and Rao, J.S. (2010) Regulation of NADPH oxidase (Nox2) by lipid rafts in breast carcinoma cells. *Editorial Academy of the International Journal of Oncology*. **37**(6),11.
 142. Grulke, S., Franck, T., Gangl, M., Péters, F., Alexandra Salciccia, Deby-Dupont, G., and Serteyn, D. (2008) Myeloperoxidase assay in plasma and peritoneal fluid of horses with gastrointestinal disease. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. **72**,37-42.
 143. Chow, S.-E., Hshu, Y.-C., Wang, J.-S., and Chen, J.-K. (2007) Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *Journal of Applied Physiology*. **102**(4),1520-1527.
 144. Kuo, M.-L., Huang, T.-S., and Lin, J.-K. (1996) Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1317**(2),95-100.
 145. Batot, G., Martel, C., Capdeville, N., Wientjes, F., and Morel, F. (1995) Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b₅₅₈. *European Journal of Biochemistry*. **234**,208-215.
 146. Gabig, T.G., English, D., Akard, L.P., and Schell, M.J. (1987) Regulation of neutrophil NADPH oxidase activation in a cell-free system by guanine nucleotides and fluoride. Evidence for participation of a pertussis and cholera toxin-insensitive G protein. *The Journal of Biological Chemistry*. **262**(4),1685-1690.
 147. Nauseef, W.M. (2007) Isolation of human neutrophils from venous blood, in *Methods in Molecular Biology - Neutrophil Methods and Protocols*, Quinn, M.T., Deleo, F.R., and Bokoch, G.M., Editors.: Totowa, New jersey. p. 15-18.
 148. Olson, B.J.S.C. and Markwell, J., eds. (2007) *Assays for determination of protein concentration*. John Wiley ed. *Current Protocols in Protein Science*: New York. 3.4.1-3.4.29.
 149. Wind, S., Beuerlein, K., Eucker, T., Müller, H., Scheurer, P., Armitage, M., Ho, H., Schmidt, H., and Wingler, K. (2010) Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxydase inhibitors. *British Journal of Pharmacology*. **161**,885-898.
 150. Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Costamagna, C., Bosia, A., and Ghigo, D. (2004) Diphenyleneiodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**(46),47726-47731.
 151. Leiro, J., Alvarez, E., Arranz, J.A., Laguna, R., Uriarte, E., and Orallo, F. (2004) Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *Journal of Leukocyte Biology*. **75**(6),1156-1165.

152. Signorelli, P. and Ghidoni, R. (2005) Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **16**(8),449-466.
153. Cavallaro, A., Ainis, T., Bottari, C., and Fimiani, V. (2003) Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. *Physiological Research*. **52**(5),555-562.
154. Slater, S.J., Seiz, J.L., Cook, A.C., Stagliano, B.A., and Buzas, C.J. (2003) Inhibition of protein kinase C by resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta*. **20**(1),59-69.
155. Park, D.-W., Baek, K., Kim, J.-R., Lee, J.-J., Ryu, S.-H., Chin, B.-R., and Baek, S.-H. (2009) Resveratrol inhibits foam cell formation via NADPH oxidase 1-mediated reactive oxygen species and monocyte chemotactic protein-1. *Experimental & Molecular Medicine*. **41**(3),171-179.
156. Orallo, F., Álvarez, E., Camiña, M., Leiro, J.M., Gómez, E., and Fernández, P. (2002) The Possible Implication of trans-Resveratrol in the Cardioprotective Effects of Long-Term Moderate Wine Consumption. *Molecular Pharmacology*. **61**(2),294-302.
157. Kang, B.-Y., Khan, J.A., Ryu, S., Shekhar, R., Seung, K.-B., and Mehta, J.L. (2010) Curcumin Reduces Angiotensin II-mediated Cardiomyocyte Growth via LOX-1 Inhibition. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. **55**(2),176-183
110.1097/FJC.1090b1013e3181ca1094ba1091.
158. Joe, B. and Lokesh, B.R. (1994) Role of capsaicin, curcumin and dietary n — 3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **1224**(2),255-263.
159. Wolfson, M., McPhail, L., Nasrallah, V., and Snyderman, R. (1985) Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme. *The Journal of Immunology*. **135**(3),2057-2062.
160. Kent, J.D., Sergeant, S., Burns, D.J., and McPhail, L.C. (1996) Identification and regulation of protein kinase C-delta in human neutrophils. *The Journal of Immunology*. **157**(10),4641-4647.
161. Neviere, R. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: Definitions, epidemiology, and prognosis. UpToDate 2013.
162. Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., and Ram, S.J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. **11**(7),36-42.
163. Nakamura, Y., Ohto, Y., Murakami, A., Osawa, T., and Ohigashi, H. (1998) Inhibitory Effects of Curcumin and Tetrahydrocurcuminoids on the Tumor Promoter-induced Reactive Oxygen Species Generation in Leukocytes in vitro and in vivo. *Cancer Science*. **89**(4),361-370.
164. Yadav, V.R., Prasad, S., Kannappan, R., Ravindran, J., Chaturvedi, M.M., Vaahtera, L., Parkkinen, J., and Aggarwal, B.B. (2010) Cyclodextrin-complexed curcumin exhibits anti-inflammatory and antiproliferative activities superior to those of curcumin through higher cellular uptake. *Biochemical Pharmacology*. **80**(7),1021-1032.
165. Barry, J., Fritz, M., Brender, J.R., Smith, P.E.S., Lee, D.-K., and Ramamoorthy, A. (2009) Determining the Effects of Lipophilic Drugs on Membrane Structure by Solid-State NMR Spectroscopy: The Case of the Antioxidant Curcumin. *Journal of the American Chemical Society*. **131**(12),4490-4498.

166. Mercader-Ros, M.T., Lucas-Abellán, C., Fortea, M.I., Gabaldón, J.A., and Núñez-Delicado, E. (2010) Effect of HP- β -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. *Food Chemistry*. **118**(3),769-773.
167. Yancey, P.G., Rodriguez, W.V., Kilsdonk, E.P., Stoudt, G.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (1996) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools and mechanism of efflux. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**(27),16026-16034.
168. Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research*. **38**(11),2264-2272.
169. Tsukamoto, M., Kuroda, K., Ramamoorthy, A., and Yasuhara, K. (2014) Modulation of raft domains in a lipid bilayer by boundary-active curcumin. *Chemical Communications*. **50**(26),3427-3430.
170. Mahmmod, Y.A. (2007) Modulation of protein kinase C by curcumin; inhibition and activation switched by calcium ions. *British Journal of Pharmacology*. **150**(2),200-208.
171. Maraldi, T. Natural Compounds as Modulators of NADPH Oxidases: Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2013;2013:271602. Epub 2013 Nov 27.
172. Altenhofer, S., Radermacher, K.A., Kleikers, P.W., Wingler, K., and Schmidt, H.H. (2014) Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. *Antioxidant & Redox Signaling*. **26**,26.
173. Daiber, A., August, M., Baldus, S., Wendt, M., Oelze, M., Sydow, K., Kleschyov, A.L., and Munzel, T. (2004) Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free Radical Biology and Medicine*. **36**(1),101-111.
174. Das, L. and Vinayak, M. (2014) Long Term Effect of Curcumin in Regulation of Glycolytic Pathway and Angiogenesis via Modulation of Stress Activated Genes in Prevention of Cancer. *PLoS One*. **9**(6),e99583.
175. Thermoscientific. Thermoscientific website. 2015 [cited 2015 03 24]; Available from: <http://www.thermoscientific.com/content/tfs/en/product/nunc-fluoronunc-luminunc-96-well-plates.html>.
176. Zielonka, J., Lambeth, J.D., and Kalyanaraman, B. (2013) On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation. *Free Radical Biology & Medicine* **65**,1310-1314.
177. Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B., and Barsoum, J. (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**(2),664-668.
178. Serteyn, D., Benberek, H., Deby-Dupont, G., Grulke, S., Caudron, I., Deby, C., and Lamy, M. (1999) Effects of acepromazine on equine polymorphonuclear neutrophil activation: a chemiluminescence study. *The Veterinary Journal*. **157**,332-335.
179. Pick, E., Bromberg, Y., Shpungin, S., and Gadba, R. (1987) Activation of the superoxide forming NADPH oxidase in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. Characterization of the membrane-associated component. *Journal of Biological Chemistry*. **262**(34),16476-16483.
180. Song, H.Y., Ju, S.M., Seo, W.Y., Goh, A.R., Lee, J.K., Bae, Y.S., Choi, S.Y., and Park, J. (2011) Nox2-based NADPH oxidase mediates HIV-1 Tat-induced up-regulation of VCAM-1/ICAM-1 and subsequent monocyte adhesion in human astrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*. **50**(5),576-584.

181. Cheng, P.W., Ho, W.Y., Su, Y.T., Lu, P.J., Chen, B.Z., Cheng, W.H., Lu, W.H., Sun, G.C., Yeh, T.C., Hsiao, M., and Tseng, C.J. (2014) Resveratrol decreases fructose-induced oxidative stress, mediated by NADPH oxidase via an AMPK-dependent mechanism. *British Journal of Pharmacology*. **171**(11),2739-2750.
182. Zhao, W.C., Zhang, B., Liao, M.J., Zhang, W.X., He, W.Y., Wang, H.B., and Yang, C.X. (2014) Curcumin ameliorated diabetic neuropathy partially by inhibition of NADPH oxidase mediating oxidative stress in the spinal cord. *Neuroscience Letters*. **560**,81-85.
183. Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Saha, B.P., and Mukherjee, P.K. (2007) Curcumin–phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. **330**(1–2),155-163.
184. Nauseef, W.M., Volpp, B.D., McCormick, S., Leidal, K.G., and Clark, R.A. (1991) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase - Protein kinase C promote cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase. *Journal of Biochemical Chemistry*. **9**(March 25),5911-5917.